

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 5 月 3 日 (03.05.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/31038 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/62, 1/21, 9/80,  
11/12, C07K 17/12, 19/00, C12P 17/18, 21/02 // (C12N  
9/80, C12R 1:19) (C12P 21/02, C12R 1:19) (C12N 9/80,  
C12R 1:465) (C12P 21/02, C12R 1:465)

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/07275

(22) 国際出願日: 2000 年 10 月 19 日 (19.10.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平 11/301699  
1999 年 10 月 22 日 (22.10.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 藤沢  
薬品工業株式会社 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL

CO., LTD.) [JP/JP]; 〒541-8514 大阪府大阪市中央区道  
修町3丁目4番7号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 田中渥夫  
(TANAKA, Atsuo) [JP/JP]; 〒619-0224 京都府相楽郡  
木津町兜台7丁目9番地7 Kyoto (JP). 植田充美 (UEDA,  
Mitsuyoshi) [JP/JP]; 〒665-0033 兵庫県宝塚市伊子  
志3丁目2-47 Hyogo (JP). 長尾康次 (NAGAO, Koji)  
[JP/JP]; 〒490-1111 愛知県海部郡甚目寺町甚目寺西  
大門130-2-202 Aichi (JP).

(74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒  
300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階  
Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): CA, CN, JP, KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,  
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

[続葉有]

(54) Title: GENETIC ENGINEERING IMMOBILIZATION OF HETEROMER PEPTIDES

(54) 発明の名称: ヘテロマーペプチドの遺伝子工学的固定化

(57) Abstract: A method of immobilizing heteromer peptides having a plural number of subunits, which are formed by cutting off precursor peptides, on a chitin or cellulose carrier by expressing a protein carrying a chitin-cellulose binding domain (CBD) fused therewith by using a genetic engineering technique. Heteromer peptides having a chitin-cellulose binding domain fused therewith; and a method of immobilizing these heteromer peptides. These heteromer peptides having a chitin-cellulose binding domain are useful in techniques for immobilizing catalytic enzymes for producing useful substances, etc. The method of immobilizing heteromer peptides is applicable to industrial uses.

(57) 要約:

遺伝子組換え技術を用いてキチン・セルロース結合ドメイン (CBD) を融合させ  
た蛋白質を発現させることで、前駆体ペプチドの切断により生成される、複数の  
サブユニットを持つヘテロマーペプチドをキチンまたはセルロース担体に固定化  
する方法を開発した。本発明は、キチン・セルロース結合ドメインを融合させた  
ヘテロマーペプチド、および該ヘテロマーペプチドを固定化する方法を提供する。  
キチン・セルロース結合ドメインを持つヘテロマーペプチドは、有用物質を生成  
するための触媒酵素などの固定化技術として有用である。本発明の方法に基づく  
ヘテロマーペプチドの固定化方法は、工業的な用途にも応用することができる。



添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

### ヘテロマーペプチドの遺伝子工学的固定化

#### 技術分野

本発明は、ヘテロマーペプチドの固定化に関する。具体的には、キチン・セルロース結合ドメインを融合させたヘテロマーペプチド、および該ヘテロマーペプチドをキチン・セルロースに固定化する方法に関する。

#### 背景技術

酵素を担体に固定化することは生物工学的に重要な意味を持っており、工業、研究、および臨床場面において、担体に固定化された様々な酵素が用いられている。酵素の固定化には、物理的に吸着させる方法や共有結合により結合させる方法などがある。例えば、遺伝子工学的に酵素を固定化するために、担体やある種の蛋白質に結合活性を有するペプチドを、目的の酵素に融合させる方法が用いられる場合がある。このようなペプチドの例としては、セルラーゼやキチナーゼなどの酵素中に存在するセルロースまたはキチンに特異的に吸着するアフィニティーペプチド(以後「セルロース・キチン結合ドメイン(cellulose or chitin binding domain; CBD)」という)が知られている。セルロースやキチンは安価で毒性がなく、また化学的に安定であるため、酵素を固定化するための担体として適している。また、膜状、粉末状、ビーズ状などの形態に加工することも容易である。実際、CBDを融合させた酵素蛋白質を、その活性を保ったまま固定化する技術が開発されている(E. Ong et al., 1991, Enzyme Microb. Technol. 13: 59-65)。また、セルロース・キチン結合ドメインは複数の生物の各種酵素から単離・同定されており、これらは種々の酵素の固定化に利用できることが示されている(例えばP. Tomme et al., 1996, Ann. N. Y. Acad. Sci. 799: 418-424参照)。しかし、これ

までCBDを用いた固定化が試みられてきた酵素はいずれも単体で働くモノメリックな酵素であり、サブユニット構造を持つ酵素を、CBDを用いて固定化した例は存在しない。

複数のサブユニットから構成されるヘテロマーからなる酵素は、工業的にも重要なものが多い。例えばこのような酵素としては、 $\alpha$ および $\beta$ サブユニットから構成されるヘテロマー蛋白質である 7- $\beta$ -(4-カルボキシブタンアミド)-セファロスポラン酸アシラーゼ（「GL-7ACAアシラーゼ」と略す）が挙げられる。7-アミノセファロスポラン酸（7-ACA）は、セファロ系抗生物質の重要中間体であり、微生物により生産されるセファロスポラン酸（CC）を出発材料として、化学合成、あるいは酵素反応の技術を利用して、工業的に合成、産生されている。GL-7ACAアシラーゼは、CCから7-ACAの酵素合成法の間mediateであるグルタリル-7-ACAを基質として、脱アミノアシル反応を触媒し、7ACAを産生する工程に利用される。従って、この酵素を、活性を保ったまま簡便に固定化する技術を開発することは、工業的利用の観点から高い有用性を持っている。GL-7ACAアシラーゼは、ペニシリンアシラーゼ、他のセファロスポラン酸アシラーゼなどと同様にヘテロマーペプチドからなる酵素であり、酵素遺伝子の発現により前駆体ペプチドが合成された後に、特異的なプロセッシング機構によりペプチドが切断されて多量体となることが知られている。このような酵素は、サブユニットの一方のみを固定したのでは、活性を発現することができないと考えられていた。あるいは、たとえ一方のサブユニットを固定し、他方のサブユニットをこれに結合させることによって固定化したとしても、工業的な用途に耐えうる安定性は期待できない恐れがあった。

### 発明の開示

本発明は、キチン・セルロース結合ドメイン（CBD）を融合させたヘテロマーペプチドおよびその利用を提供することを課題とする。また本発明は、該ヘテロマーペプチドの製造方法および該ヘテロマーペプチドを固定化する方法等を提供す

ることを課題とする。

本発明者らは、GL-7ACAアシラーゼを例として、遺伝子工学的な手法を応用したヘテロマーペプチドの固定化を目指し、鋭意研究を重ねた。具体的には、GL-7ACAアシラーゼ遺伝子に、セルロース・キチン結合ドメイン(CBD)を融合させ、大腸菌を宿主としてこの遺伝子を発現させ、CBDの働きによりキチンビーズにGL-7ACAアシラーゼを固定化した。本発明において、GL-7ACAアシラーゼの3つの異なる部位にCBDを遺伝子工学的に融合させた遺伝子を作製し、それらの発現を試みたところ、すべての融合遺伝子について、キチンへの特異的な吸着と吸着状態での活性の発現に成功した。本発明のヘテロマーペプチドの作製は、環状リボペプチドのアシル化を媒介する環状リボペプチドアシラーゼを含む他の様々なアシラーゼ等にも適用することが可能である。これらの事実に基づき本発明者らは、キチン・セルロース結合ドメインを有する前駆体ペプチドを調製することにより、活性を保持したままキチンまたはセルロースに固定化が可能なヘテロマーペプチドを製造することが可能であることを見出し本発明を完成させた。

すなわち本発明は、キチン・セルロース結合ドメインを融合させたヘテロマーペプチド、該ヘテロマーペプチドの製造方法、該ヘテロマーペプチドを固定化する方法、および該ヘテロマーペプチドの利用等を提供するものであり、より具体的には、

〔1〕 前駆体ペプチドの切断により生成されるヘテロマーペプチドを構成するサブユニットの少なくとも1つがキチン・セルロース結合ドメインを付加されているヘテロマーペプチド、

〔2〕 ヘテロマーペプチドが自己スプライシングによって生成される蛋白質である、〔1〕に記載のペプチド、

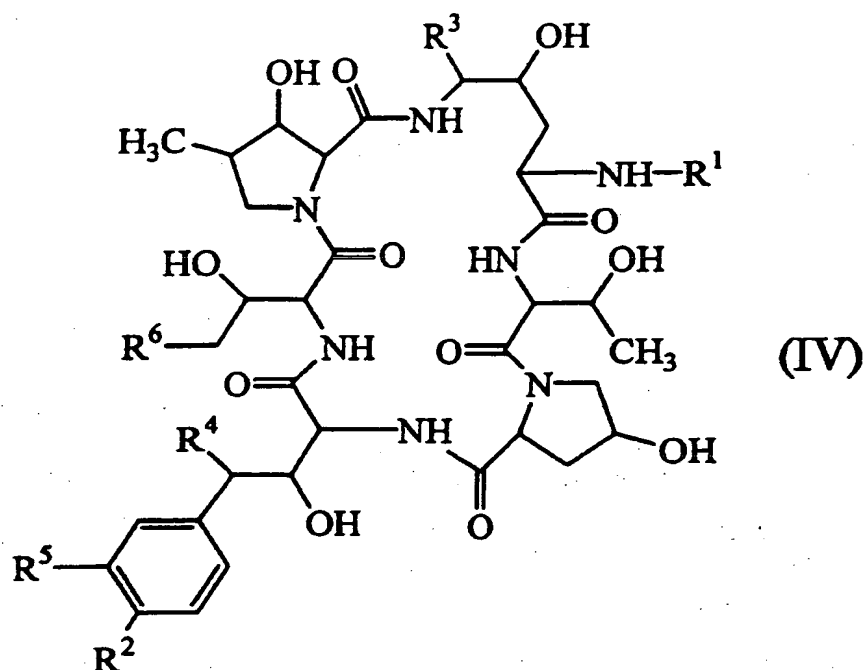
〔3〕 自己スプライシングによって生成される蛋白質がアミノアシラーゼである、〔2〕に記載のペプチド、

〔4〕 アミノアシラーゼが7- $\beta$ -(4-カルボキシブタンアミド)-セファ

ロスポラン酸アシラーゼである、〔３〕に記載のペプチド、

〔５〕自己スプライシングによって生成される蛋白質が環状リボペプチドアシラーゼである、〔２〕に記載のペプチド、

〔６〕環状リボペプチドアシラーゼが式：



(式中  $R^1$  はアシル基、 $R^2$  はヒドロキシ基またはアシルオキシ基、 $R^3$  は水素またはヒドロキシ基、 $R^4$  は水素またはヒドロキシ基、 $R^5$  は水素またはヒドロキシスルホニルオキシ基、および  $R^6$  は水素またはカルバモイル基を意味する) で示される化合物IVのアシル化を触媒するアシラーゼである、〔５〕に記載のペプチド、

〔７〕〔１〕に記載のヘテロマーペプチドの前駆体ペプチド、

〔８〕前駆体ペプチドが、以下の (a)、(b)、または (c) のいずれかのペプチドである〔７〕に記載の前駆体ペプチド、

(a) 配列番号：１７、配列番号：１９、配列番号：２１、および配列番号：２８に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含むペプチド

(b) 配列番号：１７、配列番号：１９、配列番号：２１、および配列番号：２

8に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれかのアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加したアミノ酸配列からなり、かつキチンまたはセルロースへの結合活性とアミノアシラーゼ活性を有するヘテロマーを構成することができるペプチド

(c) 配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、および配列番号：27に記載の塩基配列からなる群から選択されるいずれかの塩基配列を有するDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズすることができるDNAによってコードされ、かつキチン・セルロースへの結合活性とアミノアシラーゼ活性を有するヘテロマーを構成することができるペプチド

〔9〕〔8〕に記載の前駆体ペプチドをコードするDNA、

〔10〕〔9〕に記載のDNAを含む発現ベクター、

〔11〕〔10〕に記載の発現ベクターによって形質転換された宿主細胞、

〔12〕〔11〕に記載の宿主細胞を培地で培養し、宿主細胞および／またはその培養上清からヘテロマーペプチドまたは該ヘテロマーペプチドの前駆体ペプチドを回収することを特徴とする、〔1〕に記載のヘテロマーペプチドまたは該ヘテロマーペプチドの前駆体ペプチドの製造方法、

〔13〕〔1〕に記載のヘテロマーペプチドまたは該ヘテロマーペプチドの前駆体ペプチドを、キチンおよび／またはセルロースに接触させる工程を含む、固定化ヘテロマーペプチドの製造方法、

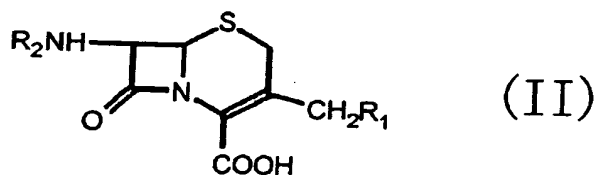
〔14〕〔1〕に記載のヘテロマーペプチドにおけるキチン・セルロース結合ドメインがキチンおよび／またはセルロースに結合している固定化ヘテロマーペプチド、

〔15〕(a) 〔14〕に記載の固定化ヘテロマーペプチドに、該ヘテロマーペプチドの基質を接触させる工程、および

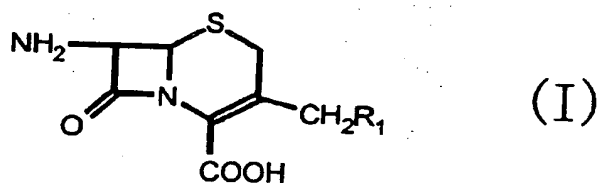
(b) 工程(a)における反応生成物を回収する工程、を含む、固定化ヘテロマーペプチドに触媒されて生じる反応生成物の製造方法、

〔16〕〔4〕に記載のヘテロマーペプチドにおけるキチン・セルロース結合ドメインがキチンおよび／またはセルロースに結合している固定化ヘテロマーペプチドに、

式：



(式中、 $R_1$  はアセトキシ、ヒドロキシまたは水素、 $R_2$  は炭素数3～8のカルボキシアルカノイルまたはD-グルタミルを示す) で示される化合物 (II) またはその塩を接触させて、式：

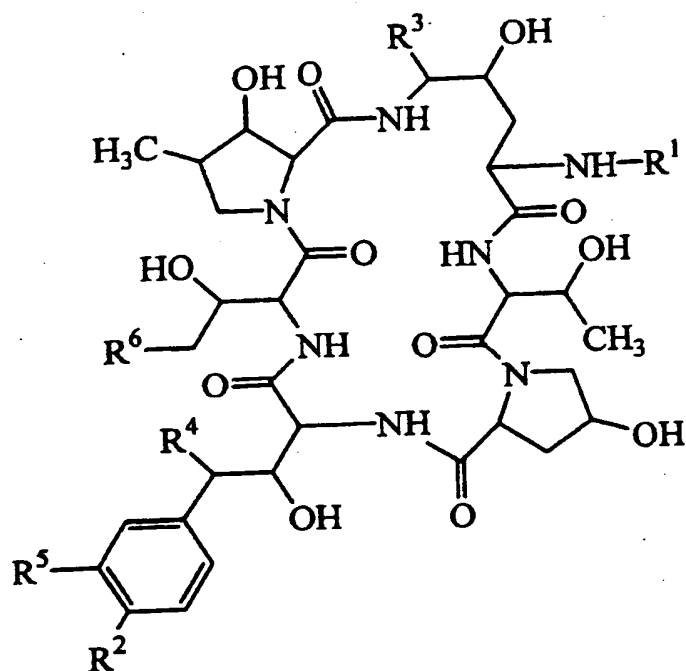


(式中、 $R_1$  はアセトキシ、ヒドロキシまたは水素を示す) で示される化合物 (I) またはその塩を得ることを特徴とする化合物 (I) の製造法、

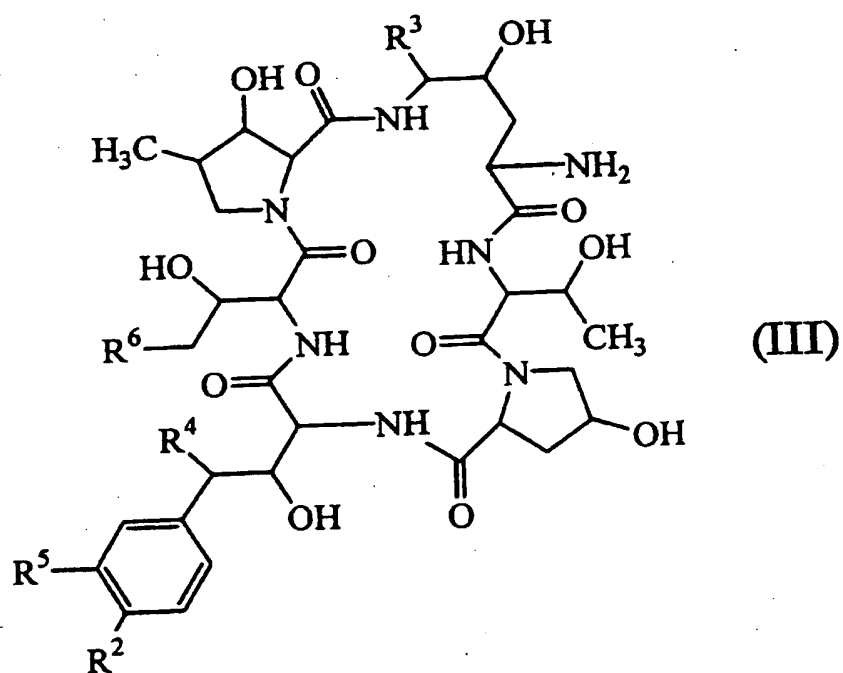
〔17〕〔6〕に記載のヘテロマーペプチドにおけるキチン・セルロース結合ドメインがキチンおよび／またはセルロースに結合している固定化ヘテロマーペプチドに、

式：





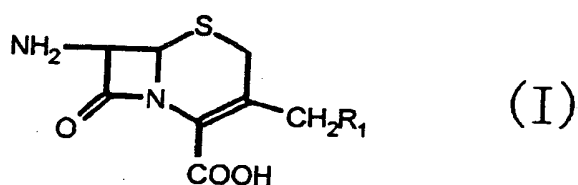
(式中 R<sup>1</sup> はアシル基、R<sup>2</sup> はヒドロキシ基またはアシルオキシ基、R<sup>3</sup> は水素またはヒドロキシ基、R<sup>4</sup> は水素またはヒドロキシ基、R<sup>5</sup> は水素またはヒドロキシスルホニルオキシ基、および R<sup>6</sup> は水素またはカルバモイル基を意味する) で示される化合物 (IV) またはその塩を接触させて、式:



(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$  および  $R^6$  は前記と同じ基を意味する) で示される化合物 (III) またはその塩を得ることを特徴とする化合物 (III) の製造法、

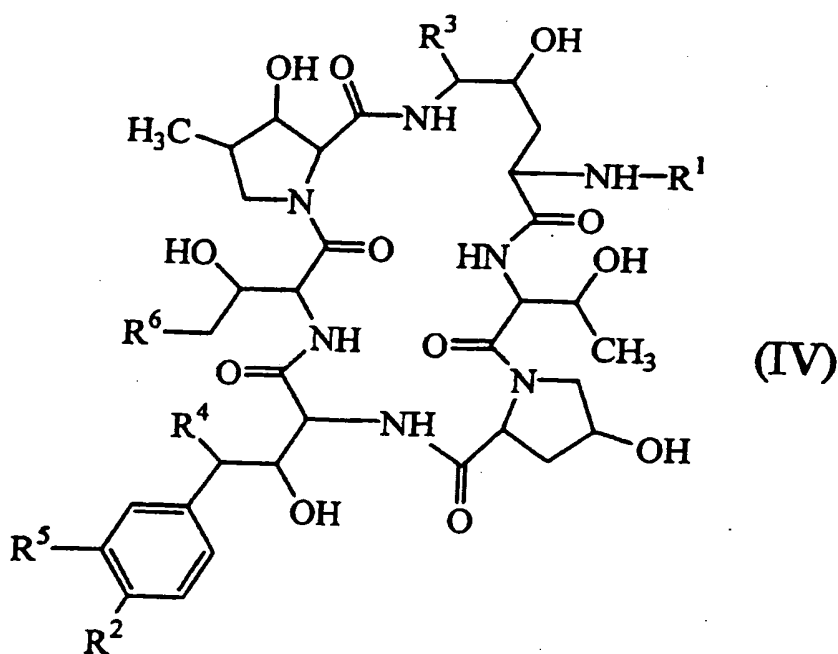
〔18〕 7- $\beta$ -(4-カルボキシブタンアミド)-セファロスポラン酸アシラーゼを構成するサブユニットの少なくとも1つにキチン・セルロース結合ドメインを付加し、該キチン・セルロース結合ドメインをキチンおよび/またはセルロースに固定化してなる、

式：



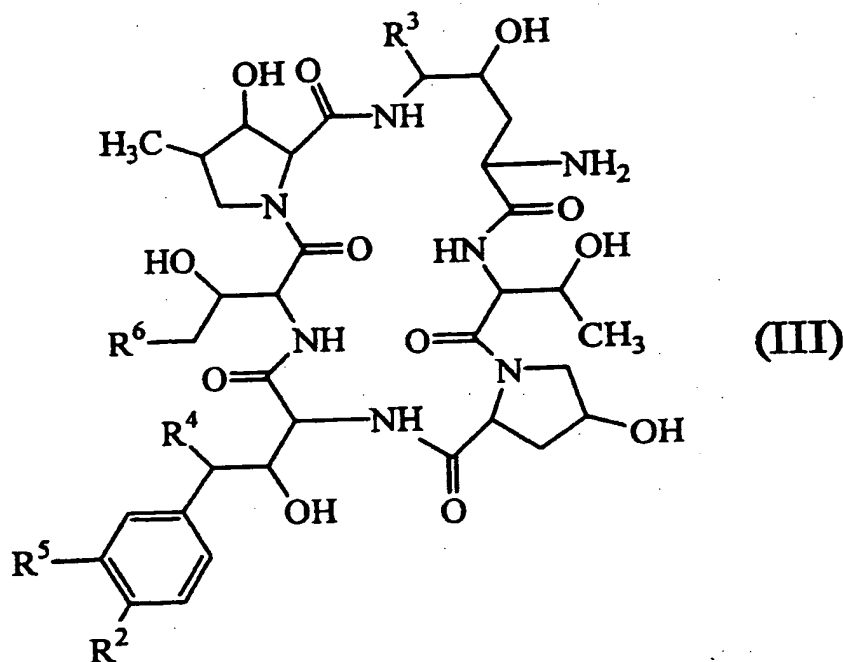
(式中、 $R_1$  はアセトキシ、ヒドロキシまたは水素を示す) で示される化合物 (I) 製造用の固定化酵素、

〔19〕 式：



(式中  $R^1$  はアシル基、 $R^2$  はヒドロキシ基またはアシルオキシ基、 $R^3$  は水素また

はヒドロキシ基、 $R^4$  は水素またはヒドロキシ基、 $R^5$  は水素またはヒドロキシスルホニルオキシ基、および  $R^6$  は水素またはカルバモイル基を意味する) で示される化合物 (IV) またはその塩のアシル化を触媒する環状リボペプチドアシラーゼを構成するサブユニットの少なくとも 1 つにキチン・セルロース結合ドメインを付加し、該キチン・セルロース結合ドメインをキチンおよび/またはセルロースに固定化してなる、式：



(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$  および  $R^6$  は前記と同じ基を意味する) で示される化合物 (III) 製造用の固定化酵素、に関するものである。

本発明は、前駆体ペプチドの切断により生成されるヘテロマーペプチドを構成するサブユニットの少なくとも 1 つがキチン・セルロース結合ドメインを付加されているヘテロマーペプチドに関する。本発明におけるヘテロマーペプチドとは、該ヘテロマーペプチドをコードする遺伝子の転写および翻訳により、まず一本鎖の前駆体ペプチドが合成された後、該前駆体ペプチドがプロセッシングにより切断を受けて生成する、2 つ以上のサブユニットからなるヘテロマーペプチドであって、該ヘテロマーペプチドを構成するサブユニットの少なくとも 1 つにキチ

ン・セルロース結合ドメインが付加されているヘテロマーペプチドである。

ここで、「キチン・セルロース結合ドメイン」とは、キチンおよび／またはセルロースに結合するペプチドドメインを指す。このようなドメインは、セルラーゼ (cellulase)、キシラナーゼ (Xylanase)、グルカナーゼ (Glucanase) およびキチナーゼ (Chitinase) などの酵素中によく見出される (P. Tomme et al., 1996, Ann. N. Y. Acad. Sci. 799: 418-424; T. Watanabe et al., 1994, J. Bacteriol. 176: 4465-4472)。本発明で用いられるキチン・セルロース結合ドメインとしては、キチンおよび／またはセルロースに結合する限りその由来に制限はない。例えば、バシルス・サーキュランズ (*Bacillus circulans*) 由来のキチナーゼA1 (GenBank Ac. No. M57601, J05599) の部分ペプチド (配列番号: 22) が挙げられる。

ヘテロマーペプチドを担体に固定化するために、キチン・セルロース結合ドメイン以外的高分子ポリマー結合性のペプチドドメインを用いることも考えられる。このようなペプチドドメインとしては、ポリマー分子資化酵素の基質結合ドメインが挙げられる。例えば、ポリ(ヒドロキシアルカン酸) (PHA) デポリメラーゼのPHA結合ドメイン (T. Fukui et al., 1988, Biochim. Biophys. Acta 952: 164-171; A. Behrends et al., 1996, FEMS Microbiol. Lett. 143: 191-194; M. Shinomiya et al., 1997, FEMS Microbiol. Lett. 154: 98-94) や、ポリウレタン (PUR) を分解する酵素 (PURエステラーゼ等) のPUR表面結合ドメイン (T. Nakajima-Kambe et al., 1999, Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: 134-140)、その他の固体ポリエステル分解酵素ファミリーの基質結合ドメインなどを用いることが考えられる。また、ポリヒドロキシブチル酸 (PHB) デポリメラーゼの基質結合ドメイン (K. Kasuya et al., 1999, Int. J. Biol. Macromol. 24: 329-36) を用いることもできる。これらのペプチドドメインを用いた場合は、それぞれのペプチドドメインが結合するポリマーを担体としてヘテロマーペプチドを固定化することができる。

本発明のヘテロマーペプチドは、公知の遺伝子組換え技術を用いて組換え蛋白

質として調製することが可能である。すなわち、目的のヘテロマーペプチドのサブユニットをコードするDNAに、キチン・セルロース結合ドメインをコードするDNAを、蛋白質の読み枠が一致するように結合し、該サブユニットと該キチン・セルロース結合ドメインとの融合蛋白質を産生させればよい。キチン・セルロース結合ドメインを融合させる位置は、ヘテロマーペプチドが形成され、かつそのペプチド本来の活性が維持される限り特に制限はない。例えば、キチン・セルロース結合ドメインを1つのサブユニットのN末端またはC末端に付加したり、サブユニットポリペプチド内に挿入したりすることが可能である。

本発明のヘテロマーペプチドの由来としては、前駆体ペプチドの切断により生成される任意のヘテロマーペプチドを用いることができる。このようなペプチドとしては、例えば、ホルモン、サイトカイン、酵素、シグナル伝達因子、受容体などが含まれる。サブユニット同士が、例えばジスルフィド結合などにより結合されているものも含まれる。このような蛋白質としては、例えばインスリン、インスリン受容体、NMDA (N-methyl-D-aspartate) 受容体、HGF (hepatocyte growth factor; 肝細胞増殖因子) などが挙げられるがこれらに制限されない。

天然型ペプチドにキチン・セルロース結合ドメインが付加されるペプチドとしては、天然型のアミノ酸配列からなるペプチドであってもよく、また、天然型ペプチドのアミノ酸配列が、1または複数のアミノ酸の置換、欠失、付加および/または挿入により改変されたペプチドであってもよい。このようなアミノ酸配列の改変は、ヘテロマーペプチドの安定性や活性を向上させるために行われ得る。

本発明のヘテロマーペプチドとしては、好ましくは自己スプライシングにより生成される蛋白質である。自己スプライシングとは、プロテアーゼなどの他の分子の触媒作用によらず、自律的に前駆体ペプチドの切断とヘテロマーの生成を行って蛋白質の活性を発現することを意味する。

このような蛋白質には、インティン (Intein; Pietrokovski, S., 1998, Protein Sci. 7: 64-71)、N末求核型加水分解酵素 (N-terminal nucleophile Hydrolase;

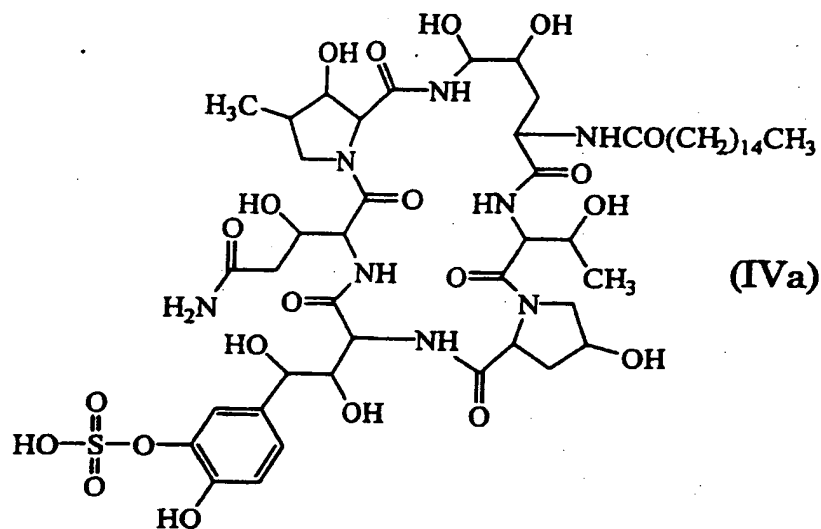
Ntn) (J. A. Brannigan et al., 1995, Nature 378: 416-419)、アミノアシラーゼ類等の蛋白質が含まれる。例えば、インティンには、酵母膜 ATPase (Chong, S. et al., 1998, J. Biol. Chem., 273: 10567-77; Chong, S. et al., 1996, J. Biol. Chem. 271: 22159-68)、およびピロコッカス・コダカラエンシス (*Pyrococcus kodakaraensis*) DNA ポリメラーゼ (Nishioka, M. et al., 1998, Nucleic Acids Res. 26: 4409-12) などが含まれる。また、N末端核型加水分解酵素には、例えば、バクテリアグリコシルアスパラギナーゼ (bacterial glycosylasparaginase) (Liu, Y. et al., 1998, J. Biol. Chem. 273: 9688-94)、プロテアソーム (proteasome) (Ditzel, L. et al., 1998, J. Mol. Biol. 279: 1187-91)、およびペニシリンアシラーゼ等が含まれる。

中でも、本発明における好ましいヘテロマーペプチドはアミノアシラーゼである (Sudhakaran, V. K. et al., 1992, Process Biochemistry 27: 131-143)。アミノアシラーゼとは、アシルアミノ基を加水分解してアミノ基とする反応を触媒する酵素である。本発明において、アミノアシラーゼには、例えばペニシリンアシラーゼ (Oh, S. J. et al., 1987, Gene 56: 87-97; Verhaert, R. M. et al., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3412-8)、セファロスポラン酸アシラーゼ (Matsuda, A et al., 1987, J. Bacteriol. 169: 5821-6; Sudhakaran, V. K. et al., 1992, Process Biochemistry 27: 131-143; Aramori, I. et al., 1991, J. Fermentation Bioengineering 72: 232-243)、および Aculeasin A様の環状リボポリペプチドアシラーゼやエキノカンジン B デアシラーゼ (*A. utahensis*由来リボペプチドアシラーゼ) (Inokoshi, J. et al., 1992, Gene 119: 29-35; 特開平 4-228072; 国際公開番号 W097/32975) のような蛋白質が含まれる。

これらのアミノアシラーゼの中でも、 $\gamma$ - $\beta$ -(4-カルボキシブタンアミド)-セファロスポラン酸アシラーゼ (「GL-7ACAアシラーゼ」と略す) は、上述のように工業的有用性の高い酵素である (例えば Ishii, Y. et al., 1995, Eur. J. Biochem. 230: 773-8; Saito, Y. et al., 1996, Annals. N. Y. Acad. Sci. 782:

226-240; 都築勝昭ら, 1989, Nippon Nogeikagaku Kaishi 63: 1847-1853 等を参照)。GL-7ACAアシラーゼは、例えば FERM BP-3425 で特定されるシュードモナス・メンドーシナ (*Pseudomonas mendocina*) C427 株由来の蛋白質が好適に用いられる (特開平7-313161参照)。C427 株由来のGL-7ACAアシラーゼにキチン・セルロース結合ドメインが付加されている本発明のヘテロマーペプチドとしては、例えば配列番号: 17、19、または21に記載のアミノ酸配列からなる前駆体ペプチドから生成されるヘテロマーペプチドが好適に用いられるが、これらに制限されない。また、*Pseudomonas* 属由来の V22 (Aramori, I. et al., 1991, J. Fermentation Bioengineering 72: 232-243)、および A14 (Aramori, I. et al., 1992, J. Fermentation Bioengineering 73: 185-192) などを用いることもできる。

また、上記の環状リボペプチドアシラーゼとしては、環状リボペプチドのアシルアミノ基を脱アシル化する活性を有する限り特に制限はない。本発明において「環状リボペプチド」とは、ポリペプチド環を有し、該環上に側鎖としてアシルアミノ基を有する化合物を言う。該化合物は、さらに他の側鎖を有していてもよい。該環状リボペプチドの例としては、前記構造式 (IV) で示される化合物が挙げられる。この化合物には、下記構造式 [IVa] で示される FR901379物質 (特開平3-184921号公報に記載) が含まれる。環状リボペプチドアシラーゼとしては、より具体的には、例えば *Streptomyces* 属由来の環状リボペプチドアシラーゼが例示できる。*Streptomyces* 属由来の環状リボペプチドアシラーゼは、例えば国際公開番号 W097/32975号公報および国際特許出願番号 PCT/JP00/04285号に記載されている。例えば、*Streptomyces* sp. NO. 6907株 (国際公開番号 W097/32975号公報参照) 由来の環状リボペプチドアシラーゼにキチン・セルロース結合ドメインが付加されている本発明のヘテロマーペプチドとしては、配列番号: 28に記載のアミノ酸配列からなる前駆体ペプチドから生成されるヘテロマーペプチドが好適に用いられるが、これらに制限されない。



本発明の前駆体ペプチドは、キチン・セルロースへの結合活性を有し、かつ目的とする活性を有するヘテロマーを構成できるものである限り、任意のアミノ酸配列からなるペプチドとすることができる。したがって、アミノアシラーゼを構成する前駆体ペプチドとして示した、(a) 配列番号：17、配列番号：19、配列番号：21、および配列番号：28に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドに加えて、たとえば次の(b)または(c)に記載のペプチドも、本発明における前駆体ペプチドとして利用することができる。

(b) 配列番号：17、配列番号：19、配列番号：21、および配列番号：28に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれかのアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加したアミノ酸配列からなり、かつキチン・セルロースへの結合活性とアミノアシラーゼ活性を有するヘテロマーを構成することができるペプチド

(c) 配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、および配列番号：27に記載の塩基配列からなる群から選択されるいずれかの塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができるDNAによってコードされ、かつキチン・セルロースへの結合活性とアミノアシラーゼ活性を



有するヘテロマーを構成することができるペプチド

人工的に突然変異体を作製する方法としては、例えば、部位特異的突然変異誘発が挙げられる。より具体的には当該方法を用いて配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、および配列番号：27に記載の塩基配列に任意の変異をもたらすことにより、本発明の前駆体ペプチドの変異体を得ることができる。

本発明の前駆体ペプチドをコードする遺伝子は、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、および配列番号：27に示される塩基配列から実質的になるDNAの、全部または一部を含むものである。本発明の前駆体ペプチドをコードする遺伝子は、上記特定の塩基配列からなるDNAに加えて、ストリンジェントな条件において、上記の特定塩基配列からなるDNAとハイブリダイズし得る塩基配列からなるDNAを含む。本発明では、塩基配列において約60%以上の相同性を有するDNAがハイブリダイズし得る条件をストリンジェントな条件という。ストリンジェンシーはハイブリダイズ反応や洗浄の際の温度、塩濃度等を適宜変化させることにより調節することができる。あるいは本発明の前駆体ペプチドをコードする遺伝子は、上記の特定塩基配列において少なくとも(1)60%の同一性、(2)70%の同一性、(3)80%の同一性、(4)90%の同一性、または(5)95%の同一性を有する塩基配列からなる遺伝子を含む。当該遺伝子がコードする前駆体ペプチドは、キチン・セルロース結合活性を備え、かつアミノアシラーゼ活性を有するヘテロマーを構築しうる前駆体ペプチドを含む。

また本発明は、上記本発明のヘテロマーペプチドの前駆体ペプチドに関する。また、本発明は、該前駆体ペプチドをコードするDNA、および該DNAを含む発現ベクター、該ベクターによって形質転換された宿主細胞に関する。前駆体ペプチドは、これをコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、該培養物から該前駆体ペプチドを回収することによって調製することができる。前駆体ペプチドをコードするDNAの由来としては、cDNAであっても、ゲ

ノムDNAであっても、また合成DNAであってもよい。また、本発明の前駆体ペプチドをコードするDNAには、天然型遺伝子の塩基配列を含むDNAのみならず、コドンの縮重に基づく任意の塩基配列を含むDNAが含まれる。

前駆体ペプチドをコードするDNAを構築するには、公知の遺伝子工学的技術を用いて、キチン・セルロース結合ドメインを付加しようとする部位に、キチン・セルロース結合ドメインをコードするDNAをフレームが一致するように挿入すればよい。前駆体ペプチドの発現によりヘテロマーペプチドが生成し、本来の酵素活性を維持するかぎり、キチン・セルロース結合ドメインを挿入する位置に制限はなく、各サブユニットのN末端、C末端、または中間に挿入され得る。キチン・セルロース結合ドメインは、ヘテロマーペプチドを構成する少なくとも1つの任意のサブユニットに挿入することができる。また、複数のサブユニットに対して挿入することもできる。例えば、GL-7ACAアシラーゼにおいては、 $\alpha$ または $\beta$ サブユニットのN末端、C末端、または中間にキチン・セルロース結合ドメインを挿入することにより、ヘテロマーペプチドが構成され、酵素活性が維持される。該ヘテロマーペプチドの前駆体ペプチドをコードするDNAとしては、具体的には、例えば配列番号：16、18、または20に記載の塩基配列を有するDNAが挙げられる。また、例えば、*Streptomyces* sp. NO. 6907株由来の環状リボペプチドアシラーゼの大サブユニットのC末端にキチン・セルロース結合ドメインが挿入されたヘテロマーペプチドの前駆体ペプチドをコードするDNAとしては、具体的には、例えば配列番号：27に記載の塩基配列を有するDNAが挙げられる。キチン・セルロース結合ドメインが挿入される位置はこれに限定されず、任意のサブユニットのN末端、C末端、または中間に挿入することができる。

以下、組換えDNA技術による調製法について、その詳細を説明する。宿主細胞としては特に制限はないが、例えば細菌が挙げられる。細菌としては、エシェリキア (*Escherichia*) 属に属する菌株 (例えば *E. coli* JM109 ATCC 53323, *E. coli* HB101 ATCC 33694, *E. coli* MN102, *E. coli* HB101-16 FERM BP-1872, *E. coli* 294

ATCC 31446など)、バシラス (*Bacillus*) 属に属する菌株 (バシラス・サチリス (*Bacillus subtilis*) など) などが例示される。また、放線菌、例えばストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属に属する菌株 (ストレプトマイセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*) など) も挙げられる。例えば、エシェリキア属に属する菌株、具体的には *E. coli* HB101または *E. coli* JM109 などが好適に用いられる。また、T7 プロモーターが組み込まれた発現ベクター系を用いて蛋白質を発現させる場合は、T7 RNA ポリメラーゼをコードするDNAがゲノムに組み込まれた大腸菌 (例えば NEB社製の ER2566等) などが好適である。

細菌、特に *E. coli*を宿主細胞として用いる場合、一般に発現ベクターは少なくともプロモーター-オペレーター領域、開始コドン、本発明のヘテロマーペプチドの前駆体のアミノ酸配列をコードするDNA、終止コドン、ターミネーター領域および複製可能単位から構成される。

プロモーター-オペレーター領域は、プロモーター、オペレーター及び Shine-Dalgarno (SD) 配列 (例えば、AAGG など) を含むものである。好ましくは、プロモーター-オペレーター領域は、常套的に用いられるプロモーター-オペレーター領域 (例えば、*E. coli* のPL-プロモーター、trp-プロモーター、または T7 プロモーター等) を含んでいてもよい。好適な開始コドンとしては、メチオニンコドン (ATG) が例示される。

本発明の前駆体ペプチドをコードするDNAは、本発明の前駆体ペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAであれば特に制限されない。

本発明の前駆体ペプチドをコードするDNAは、従来の方法で調製することができる。例えば、DNA合成機を用いて、一部のまたは全てのDNAを合成したり、および/または形質転換体 (例えば、*E. coli*) から得られる適切なベクター (プラスミド等) に挿入された天然型ヘテロマーペプチドの前駆体をコードする完全なDNA配列を適切な方法、例えば適切な酵素 (例えば、制限酵素、アルカリホスファターゼ、ポリヌクレオチドキナーゼ、DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼなど) での処

理に加えて、常套の変異方法、例えば、カセット変異法〔Tokunaga, T. et al., Eur. J. Biochem. Vol.153, p445-449 (1985) 参照〕、PCR変異法〔Higuchi, R. et al., Nucleic Acids Res. Vol.16, p7351-7367 (1988) 参照〕、クンケル法〔Kunkel, T. A. et al., Methods Enzymol. Vol. 154, p367 (1987)など参照〕のような適切な方法でキチン・セルロース結合ドメインをコードするDNAを付加することによって調製することができる。

終止コドンとしては、常用の終止コドン（例えば、TAG、TGAなど）が例示される。ターミネーター領域としては、天然または合成のターミネーター（例えば、合成fdファージターミネーターなど）が挙げられる。

複製可能単位とは、宿主細胞中においてその全DNA配列を複製することができる能力をもつDNA化合物をいい、天然のプラスミド、人工的に修飾されたプラスミド（例えば、天然のプラスミドから調製されたDNAフラグメント）および合成プラスミドが含まれる。好適なプラスミドとしては、*E. coli*ではプラスミドpBR322、もしくはその人工的修飾物（pBR322を適当な制限酵素で処理して得られるDNAフラグメント）などが挙げられる。

発現ベクターはプロモーター、開始コドン、本発明の前駆体ペプチドのアミノ酸配列をコードするDNA、終止コドンおよびターミネーター領域を連続的かつ環状に適当な複製可能単位（プラスミド）に連結することによって調製できる。例えば、pETベクター（Novagen社）などが挙げられる。また、この際所望により、常法（例えば、制限酵素での消化、T4 DNAリガーゼを用いるライゲーション）により適当なDNAフラグメント（例えば、リンカー、他のレストリクションサイトなど）を用いることもできる。

形質転換体（形質移入体）は、上述の発現ベクターを宿主細胞に導入することにより調製できる。発現ベクターの宿主細胞への導入〔形質転換（形質移入）〕は従来公知の技術（例えば、*E. coli*の場合は Kushner法など）を用いて行うことができる。本発明のヘテロマーペプチドおよび/またはその前駆体ペプチドは、上記

の如く調製される発現ベクターを含む形質転換体を栄養培地で培養することにより製造することができる。

栄養培地は、炭素源（例えば、グルコース、グリセリン、マンニトール、フルクトース、ラクトースなど）および無機窒素もしくは有機窒素源（例えば硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、カゼインの加水分解物、酵母抽出物、ポリペプトン、バクトトリプトン、ビーフ抽出物など）を含んでいてもよい。また所望により、他の栄養源〔例えば、無機塩（例えば、ニリン酸ナトリウムまたはニリン酸カリウム、リン酸水素二カリウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム）、ビタミン類（例えば、ビタミンB1）、抗生物質（例えば、アンピシリン、カナマイシン）など〕を配合していてもよい。

形質転換体（形質移入体）の培養は、当業界において知られている方法により行われる。培養条件、例えば温度、培地の pH 及び培養時間は、目的のヘテロマーペプチドまたはその前駆体ペプチドの回収量が最も高くなるように選択される。通常 pH 5.5~8.5（好適には pH 7~7.5）、5~40°C（好適には 10~30°C）で 5~50時間行われる。但し、これらの条件は形質転換体により変り得る。

形質転換した宿主細胞を培地で培養し、宿主細胞および／またはその培養上清からヘテロマーペプチドまたは該ヘテロマーペプチドの前駆体ペプチドを回収することによって、本発明のヘテロマーペプチドまたは該ヘテロマーペプチドの前駆体ペプチドを製造することができる。*E. coli* を宿主とした場合、本発明のヘテロマーペプチドまたはその前駆体ペプチドは、通常培養された形質転換体のペリプラズムまたは細胞質内に存在する。よって、これらのペプチドは例えば以下の方法により取得できる。まず、濾過および遠心等の常法により細胞を集め、当該細胞の細胞壁および／または細胞膜を、例えば超音波および／またはライソザイムで処理して細胞破片を得る。次に、得られる細胞破片を適当な水溶液（例えば、20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 500 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 % Triton X-100) に溶解する。そして該溶液から、天然または合成蛋白質を精製並びに単離するため

に一般に用いられる常法に従って本発明のヘテロマーペプチドまたはその前駆体ペプチドを単離、精製する。単離、精製方法としては、透析、ゲル濾過、本発明のヘテロマーペプチドまたはその前駆体ペプチドに対するモノクローナル抗体を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィー、適当な吸着材上でのカラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーなどが例示される。得られたヘテロマーペプチドまたは該ヘテロマーペプチドの前駆体ペプチドを、キチンおよび／またはセルロースに接触させることにより、キチンおよび／またはセルロースに固定化されたヘテロマーペプチドを製造することができる。また、好ましくは、細胞破碎液を適当なバッファー中にて直接キチンまたはセルロース担体と混合し、キチンまたはセルロースに対するアフィニティーにより精製することができる。

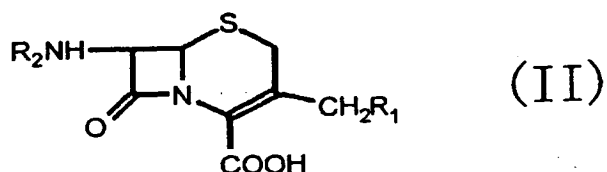
キチン・セルロース担体としては、結晶性キチン・セルロースであればよく、具体的には、バクテリオセルロース、コットンファイバー、キチン・セルロース成形ビーズなどが挙げられる。本発明のヘテロマーペプチドまたは該ヘテロマーペプチドの前駆体ペプチドは、キチン・セルロース担体へ混合することにより固定される。これらの担体は、単一の素材からなるもののみならず、複数のキチン・セルロース素材を組み合わせたものや、あるいは他の素材とキチン・セルロース担体との組み合わせによって構成されるものであることもできる。キチン・セルロース結合ドメイン以外的高分子ポリマー結合ドメインを用いた場合も同様に、様々な形態に成形された高分子ポリマーを用いることが可能である。

このようにして調製された、キチンおよび／またはセルロースに結合している固定化ヘテロマーペプチドは、種々の目的に使用することができる。例えば、物質代謝に関わる酵素が固定化された本発明の固定化ヘテロマーペプチドを利用して、種々の有用物質の製造を行うことが考えられる。そのための方法は、(a) 本発明の固定化ヘテロマーペプチドに、該ヘテロマーペプチドの基質を接触させる工程、および (b) 工程 (a) における反応生成物を回収する工程、を含む。

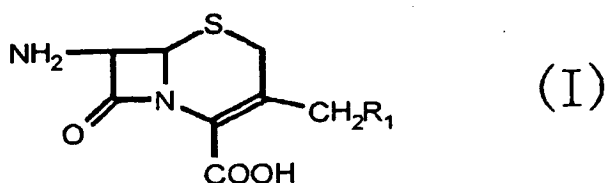
固定化ヘテロマーペプチドとその基質との組み合わせに特に制限はないが、例えば、DNAポリメラーゼを固定化し、これにDNAとヌクレオチドを作用させて、DNAの合成を行わせることができる。また、GL-7ACAアシラーゼを含む各種アシラーゼを固定化し、抗生物質の誘導体の合成を行わせることもできる。

物質の製造以外の用途としては、たとえば、ヘテロマーペプチドに結合する化合物の精製に用いることができる。また、固定化したヘテロマーペプチドを用いて、該ペプチドの機能解析を行うこともできる。さらに、固定化ヘテロマーペプチドをバイオセンサーとして用いてもよい。

本発明の固定化ヘテロマーペプチドを用いた有用物質の製造は、例えば、固定化された7- $\beta$ -(4-カルボキシブタンアミド)-セファロスポラン酸アシラーゼに、式：



(式中、 $R_1$  はアセトキシ、ヒドロキシまたは水素、 $R_2$  は炭素数3～8のカルボキシルアルカノイルまたはD-グルタミルを示す。)で示される化合物(II)またはその塩を接触させて、式：



(式中、 $R_1$  は前記と同意義である。)で示される化合物(I)またはその塩を得ることを特徴とする化合物(I)を製造するために好適に用いられうる。

キチン・セルロース結合ドメインを付加された7- $\beta$ -(4-カルボキシブタンアミド)-セファロスポラン酸アシラーゼの調製方法、および該アシラーゼの固定化は、例えば実施例に記載された方法に順じて行うことができる。

本発明でいう炭素数 3～8 のカルボキシアルカノイルとしては、直鎖状または分枝状のアシル基を有しているものが挙げられ、具体的にはカルボキシアセチル、カルボキシプロピオニル、カルボキシブチリル、カルボキシイソブチリル、カルボキシバレリル、カルボキシイソバレリル、カルボキシピバロイル、カルボキシヘキサノイル、カルボキシヘプタノイル等が例示される。

化合物 (I) および化合物 (II) の適当な塩としては、アルカリ金属塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩）が挙げられる。

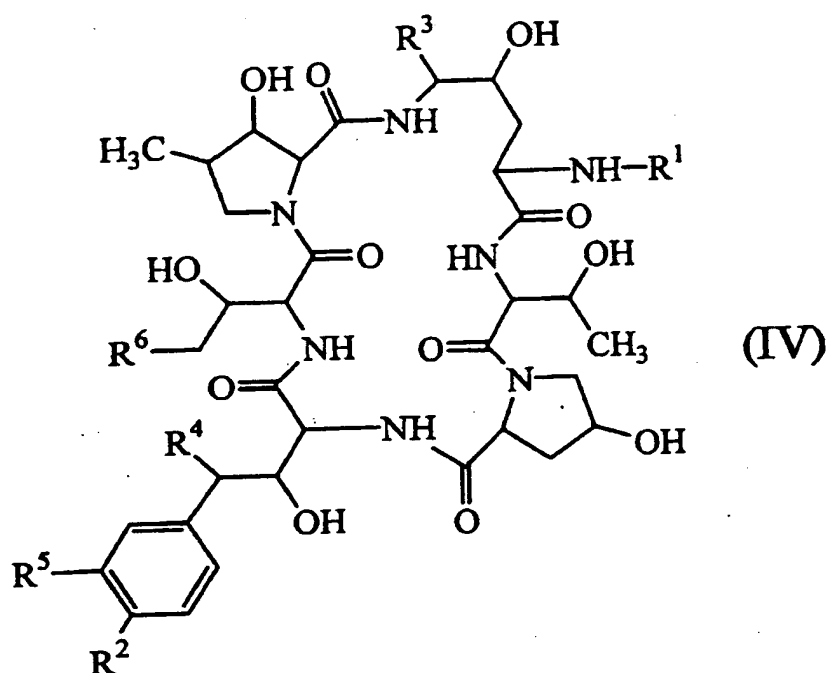
上記化合物 (I) の製造は、水または緩衝液のような水性媒質中で行うことができる。即ち、化合物 (I) の製造は、通常、化合物 (II) を含む水または緩衝液のような水性媒質中に固定化酵素を懸濁させることによって行われる。

化合物 (I) の製造は、用いる固定化酵素の性質に応じて適宜好適な pH、化合物 (II) の濃度、反応時間および反応温度を選択して行うことができる。pH は通常 6～10、好ましくは pH 7～9、反応温度は通常 5～40℃、好ましくは 5～37℃、反応時間は通常 0.5～50 時間である。

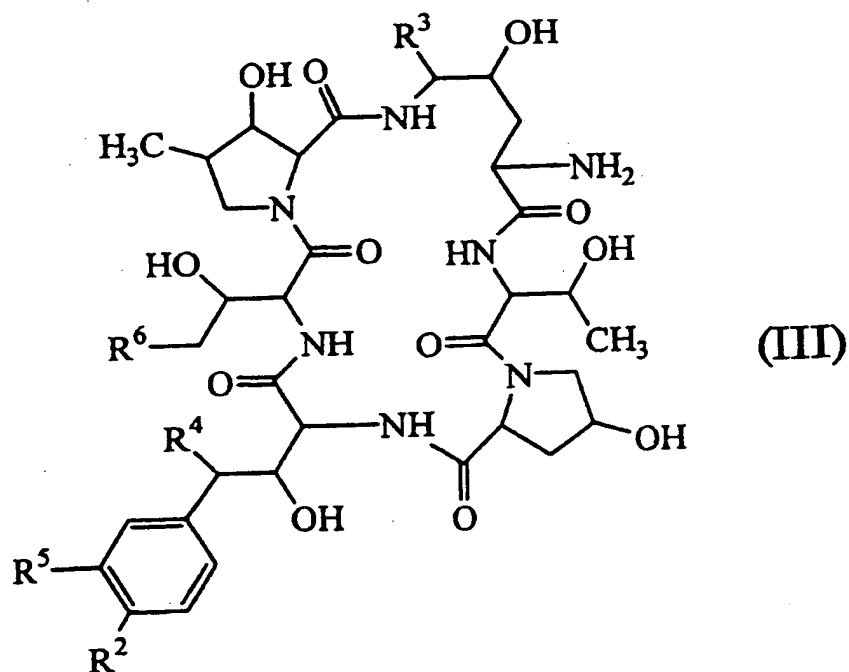
反応混液中、基質としての化合物 (II) の濃度は、1～100 mg / ml の範囲で好適に選択することができる。このようにして製造される化合物 (I) は、上記反応混液から慣用の方法で精製、単離される。

また、本発明の固定化ヘテロマーペプチドを用いた有用物質の製造は、例えば、固定化された環状リボペプチドアシラーゼに、式：





(式中  $R^1$  はアシル基、 $R^2$  はヒドロキシ基またはアシルオキシ基、 $R^3$  は水素またはヒドロキシ基、 $R^4$  は水素またはヒドロキシ基、 $R^5$  は水素またはヒドロキシスルホニルオキシ基、および  $R^6$  は水素またはカルバモイル基を意味する) で示される化合物 (IV) またはその塩を接触させて、式：



(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$  および  $R^6$  は前記と同じ基を意味する) で示される化合物 (III) またはその塩を得ることを特徴とする化合物 (III) を製造するために好適に用いられうる。

キチン・セルロース結合ドメインを付加された環状リボペプチドアシラーゼの調製方法、および該アシラーゼの固定化は、例えば実施例に記載された方法に順じて行うことができる。また、国際公開番号 W097/32975 号公報および国際特許出願番号 PCT/JP00/04285 に記載の方法に順じて行うことができる。

化合物 (IV) および化合物 (III) の適当な塩としては、慣用の無毒性のモノまたはジ塩であって、金属塩、例えばアルカリ金属塩 (例えばナトリウム塩、カリウム塩等)、アルカリ土類金属塩 (例えばカルシウム塩、マグネシウム塩等)、アンモニウム塩、有機塩基との塩 (例えば、トリメチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ピリジン塩、ピコリン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、 $N,N'$ -ジベンジルエチレンジアミン塩等) 等、有機酸付加塩 (例えばギ酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩等)、無機酸付加塩 (例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩等)、アミノ酸 (例えばアルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸等) との塩等が挙げられる。

上記化合物 (III) の製造は、水または緩衝液のような水性媒質中で行うことができる。即ち、化合物 (III) の製造は、通常、化合物 (IV) を含む水または緩衝液のような水性媒質中に固定化酵素を懸濁させることによって行われる。

化合物 (III) の製造は、用いる固定化酵素の性質に応じて適宜好適な pH、化合物 (IV) の濃度、反応時間および反応温度を選択して行うことができる。pH は通常 5 ~ 10、好ましくは pH 6 ~ 9、反応温度は通常 10 ~ 70°C、好ましくは 30 ~ 50°C、反応時間は通常 0.5 ~ 50 時間である。

反応混液中、基質としての化合物 (IV) の濃度は、1 ~ 100 mg/ml の範囲で好適に選択することができる。このようにして製造される化合物 (III) は、上記

反応混液から慣用の方法、例えば減圧濃縮、凍結乾燥、抽出、pH調整、吸着樹脂、イオン交換樹脂、晶析、再結晶等の方法を適宜組み合わせて精製、単離される。

本発明における固定化反応に供したキチンまたはセルロース担体は、活性が低下したヘテロマーペプチドを溶離再生し、新たにヘテロマーペプチドを固定化することにより、繰り返し使用することが可能である。溶離剤としては、キチン・セルロース結合ドメインの性質に応じて、蛋白質変性剤（例えばグアニジン塩酸塩溶液、尿素溶液など）、界面活性剤（例えばドデシル硫酸ナトリウム溶液など）、低極性溶剤（例えば脱塩水、エチレングリコール溶液など）等から選択でき、ヘテロマーペプチドの再固定化は、未使用の場合と同様の方法で行うことが可能である。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、キチン・セルロース結合ドメインを融合させたペプチド (C427 GL-7ACA アシラーゼ) の発現プラスミドの構造を示す図である。CBDはキチンまたはセルロース結合ドメイン、 $\alpha$ および $\beta$ はそれぞれ $\alpha$ サブユニットおよび $\beta$ サブユニット、SPはスペーサーペプチドを表す。T7は T7 プロモーターを表す。

図2は、キチン・セルロース結合ドメインを融合させたペプチド (C427 GL-7ACA アシラーゼ) の発現プラスミド (pETSS427、pETN $\alpha$ 427、pETC $\beta$ 427、および pETC $\alpha$ 427) または空ベクター (pET24a) を導入した大腸菌抽出物の SDS-PAGE (A) および抗C427 GL-7ACAアシラーゼポリクローナル抗体を用いたウェスタン解析 (B) の結果を示す写真である。

図3は、大腸菌で発現させたキチン・セルロース結合ドメインを融合させたペプチド (C427 GL-7ACAアシラーゼ) のキチンビーズ抽出物の SDS-PAGE を示す写真である。

図4は、キチン・セルロース結合ドメインを融合させた環状リボペプチドアシラーゼ (TA6907アシラーゼ) をコードするプラスミド pUAYCBD の構造を示す図である。

図5は、キチン・セルロース結合ドメインを融合させた環状リボペプチドアシラーゼ (TA6907アシラーゼ) をコードする放線菌発現プラスミド pJAYCBD の構造を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

#### 〔実施例1〕 CBD融合GL-7ACAアシラーゼ発現プラスミドの構築 pUC427の構築

pYS9107KプラスミドDNA (特開平7-313161) を、Stu Iおよび Cla Iで消化して3つの断片に切断し、切断末端をクレノウフラグメントを用いて平滑化した。これを1%のアガロースゲルで電気泳動し、C427 GL-7ACAアシラーゼ (特開平7-313161; Y. Ishii et al., 1994, J. Fermentation Bioengineering 77: 591-597) のORFを含む 2170 bpのフラグメントを分取した。これとは別に、pUC19プラスミドDNAを Kpn Iで消化した後に、同様に平滑末端化し、1%アガロースゲル電気泳動により分取した。両DNAフラグメントを、T4 DNAリガーゼでライゲーションし、大腸菌DH5 $\alpha$ にカルシウム法にてトランスフォーメーションした。大腸菌から精製したプラスミドDNAを Bam HI で消化した場合に、約 600 bpの断片が切り出されることを指標としてアンピシリン耐性菌をスクリーニングし、pUC19の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子と逆の向きに C427 GL-7ACAアシラーゼ遺伝子が組み込まれているプラスミドを選択し、pUC427とした。

#### pETSS427の構築

大腸菌を宿主として、さまざまな遺伝子産物を高発現することで知られてい

るpETシステム (Novagen社製) プラスミドに、分泌シグナルを除いたC427 GL-7ACA アシラーゼ遺伝子を組み込んだ。

$\alpha$ 鎖の5'末端に開始コドンであるATG配列を導入するため、pUC427プラスミド DNAをテンプレートとし、プライマー1、2、および pfu DNAポリメラーゼを用いた PCR反応で約 600 bpの断片を増幅した。得られた断片を Bam HI および Nde I で切断し、同様の制限酵素で切断した pUC427 に組み込み pUCSS427 を得た。さらに、このプラスミドを Sac I および Nde I で切断し、同様の制限酵素で切断した pET24a プラスミドに組み込んでpETSS427を構築した (図1)。pETSS427プラスミドの融合蛋白質のコード領域の塩基配列を配列番号：14に、この塩基配列がコードするアミノ酸配列を配列番号：15に示す。

#### pETN $\alpha$ 427の構築

C427 GL-7ACAアシラーゼ  $\alpha$ 鎖をコードするDNAの5'末端にCBDを連結発現するプラスミドを構築した。 $\alpha$ 鎖とCBDは Kpn Iサイトで連結した。

CBDとして、ペプチド精製用に用いられる IMPACT™ T7 system (New England BioLabs社製) の発現用プラスミドであるpTYB2のCBDコード領域より、プライマー3、および4を用いたPCR反応により、約 150 bpの断片を増幅した。pTYB2は、バシルス・サーキュランス (*Bacillus circulans*) キチナーゼA1由来のCBDを保持している (T. Watanabe et al., 1994, J. Bacteriol. 176: 4465-4472; GenBank Accession No. M57601, J05599)。C427 GL-7ACAアシラーゼ  $\alpha$ 鎖をコードするDNAの5'末端に Kpn Iサイトを導入するため、pUC427プラスミドをテンプレートとしてプライマー5、および2を用いたPCR反応により約 600 bpの断片を増幅した。増幅したCBD断片を Nde I、Kpn Iで、C427 GL-7ACAアシラーゼ遺伝子の5'末端断片を Kpn I、Bam HIでそれぞれ消化した。これらを Nde I、Bam HIで消化したpETSS427プラスミドに組み込み、pETN $\alpha$ 427プラスミドとした (図1)。pETN $\alpha$ 427プラスミドの融合蛋白質のコード領域の塩基配列を配列番号：16に、この塩基配列がコードするアミノ酸配列を配列番号：17に示す。配列番号：16の1位~165位(配

列番号：17の1位～55位）がCBDに相当する。

#### pETC $\beta$ 427の構築

C427 GL-7ACAアシラーゼ $\beta$ 鎖をコードするDNAの3'末端にCBDを連結発現するプラスミドを構築した。 $\beta$ 鎖とCBDは Kpn I サイトで連結した。

CBDとして、ヘブチド精製用に用いられる IMPACT™ T7 system (New England BioLabs社製) の発現用プラスミドである pTYB2 の CBD コード領域より、プライマー 6、および 7 を用いた PCR 反応により、約 150 bp の断片を増幅した。C427 GL-7ACA アシラーゼ $\beta$ 鎖をコードする DNA の 3' 末端に Kpn I サイトを導入するため、pUC427 プラスミドをテンプレートとしてプライマー 8、および 9 を用いた PCR 反応により約 150 bp の断片を増幅した。増幅した CBD 断片を Sac I、Kpn I で、C427 GL-7ACA アシラーゼ遺伝子の 3' 末端断片を Kpn I、Mlu I でそれぞれ消化した。これらを Sac I、Mlu I で消化した pUC427 プラスミドに組み込み、pUCC $\beta$ 427 プラスミドを得た。さらに、このプラスミドを Sac I および Nde I で切断し、同様の制限酵素で切断した pET24a プラスミドに組み込み、pETC $\beta$ 427 を得た (図 1)。pETC $\beta$ 427 プラスミドの融合蛋白質のコード領域の塩基配列を配列番号：18 に、この塩基配列がコードするアミノ酸配列を配列番号：19 に示す。配列番号：18 の 2077 位～2238 位 (配列番号：19 の 693 位～746 位) が CBD に相当する。

#### pETC $\alpha$ 427の構築

C427 GL-7ACA アシラーゼ $\alpha$ 鎖をコードする DNA の 3' 末端から、3 アミノ酸 (9 bp) 上流に CBD を連結発現するプラスミドを構築した。CBD の両端は、Kpn I サイトで連結した。

CBD 連結部位に Kpn I サイトを導入するため、pUC427 プラスミドをテンプレートとしてプライマー 1、および 10 を用いた PCR 反応により増幅した約 600 bp の断片と、プライマー 11、および 12 を用いて増幅した約 500 bp の断片を調製した。これらの断片を、Nde I と Kpn I、Kpn I と Nco I でそれぞれ消化し、Nde I および Nco I で切断した pETSS427 プラスミドに組み込み、pET427C $\alpha$ Kp を得た。

CBDとして、ペプチド精製用に用いられる IMPACT™ T7 system (New England BioLabs社製) の発現用プラスミドであるpTYB2のCBDコード領域より、プライマー 6、および 4を用いたPCR反応により、約 150 bpの断片を増幅した。増幅したCBD断片を Kpn I 消化し、Kpn I で消化した pET427C $\alpha$ Kpプラスミドに組み込み、pETC $\alpha$ 427プラスミドを得た(図1)。pETC $\alpha$ 427プラスミドの融合蛋白質のコード領域の塩基配列を配列番号: 20に、この塩基配列がコードするアミノ酸配列を配列番号: 21に示す。配列番号: 20の 484位~ 651位(配列番号: 21の 162位~ 217位) がCBDに相当する。

#### 配列の確認

PCR増幅部分の塩基配列は、以下に示すプライマーを用いて、蛍光標識サイクルシーケンス法により確認した。

##### pETSS427

プライマー2 (アンチセンス)  $\beta$ (5rev)

プライマー13 (センス) T7promoter

##### pETN $\alpha$ 427

プライマー2 (アンチセンス)  $\beta$ (5rev)

プライマー13 (センス) T7promoter

プライマー5 (センス) 427Kp5

##### pETC $\alpha$ 427

プライマー13 (センス) T7promoter

プライマー2 (アンチセンス)  $\beta$ (5rev)

プライマー12 (アンチセンス) Nco(under3)

プライマー4 (アンチセンス) CBDKp3

##### pETC $\beta$ 427

プライマー6 (センス) CBDKp5

プライマー8 (センス) Mlu(upver2)

プライマー配列

用いたプライマー配列を以下に示す。

プライマー1 (センス) 427Nd5 : 5'-GCGTCGCCGGTACCCTGGCCGAGCCGA-3' (配列番号 : 1)

プライマー2 (アンチセンス)  $\beta$  (5rev) : 5'-CGCCTCGTAGTAGGTGAAGTAG-3' (配列番号 : 2)

プライマー3 (センス) CBDNd5 : 5'-TGAAC TCACATATGACGACAAATCCTGGTG-3' (配列番号 : 3)

プライマー4 (アンチセンス) CBDKp3 : 5'-CCTTCCTGGGTACCTTGAAGCTGCCACAAG-3' (配列番号 : 4)

プライマー5 (センス) 427Kp5 : 5'-GCGTCGCCGGTACCCTGGCCGAGCCGA-3' (配列番号 : 5)

プライマー6 (センス) CBDKp5 : 5'-TGAAC TCAGGTACCACGACAAATCCTGGTG-3' (配列番号 : 6)

プライマー7 (アンチセンス) CBDSTP3 : 5'-TCATTGAAGCTGCCACAAGGC-3' (配列番号 : 7)

プライマー8 (センス) Mlu(upver2) : 5'-ATGAGCTACGGCAATTCTCG-3' (配列番号 : 8)

プライマー9 (アンチセンス) 427Kp3 : 5'-GGTCAGGCGGTAACCTGGCTTGAAGTT-3' (配列番号 : 9)

プライマー10 (アンチセンス) 427insKp3 : 5'-GGCGGGTCGGTACCGCCCAGGGTGCGGCCG GCGACGCGA-3' (配列番号 : 10)

プライマー11 (センス) 427insKp5 : 5'-GCCGCACCGGTACCGAGGGCGACCCGCCGGACCTGG -3' (配列番号 : 11)

プライマー12 (アンチセンス) Nco(under3) : 5'-CCGTGATCATGTCGAAATACTGCTCG-3' (配列番号 : 12)



プライマー13 (センス) T7promoter : 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (配列番号 : 13)

### 【実施例2】 組換え菌の培養法

調製したそれぞれのプラスミドは、カルシウム法により、ホストである大腸菌 ER2566株にトランスフォーメーションした。それぞれの形質転換株1白金耳量を、3 mL / 15 mL試験管のLB培地に植菌し、37°Cで約15時間培養した。この培養液 1 mL を、100 mL / 500 mLフラスコのLB培地に植菌し、30°Cで  $A_{600}$  が 0.5~0.6になるまで培養し、ここで、1 mM 濃度となるようにIPTGを加えた。IPTGの添加により、組み込んだ遺伝子の発現が誘導される。誘導開始後、培養温度を20~25°Cとして、さらに20~40時間培養し、0.2~0.5 U / mL - 培養液の酵素活性を発現した (1 unit は、GL-7ACAを基質として1分間に1  $\mu$ molの7ACAを生成する酵素量をいう)。

培養終了後、培養液を5°C、4000 rpmで10分間遠心することにより菌体を回収し、5 mLの20 mM Tris-HCl緩衝液 pH 8.5、500 mM NaCl、0.1 % Triton X-100に再懸濁した。懸濁液を超音波破碎機で、氷冷下、1分破碎を3回繰り返した後、5°C 12000 rpmで10分間遠心し、酵素可溶化溶液として上澄画分を得た。

### 【実施例3】 キチンビーズへの酵素固定化法

菌体懸濁および吸着用緩衝液 (以下、吸着緩衝液とする ; 20 mM Tris-HCl緩衝液 pH 8.5、500 mM NaCl、0.1 % Triton X-100) で平衡化、分散したキチンビーズ (New England BioLabs社製) に、酵素活性が 0.5~5 U / ml の濃度となるように可溶化酵素液を添加した。これを、5°Cで5時間以上振盪混合し、酵素をキチンビーズに吸着させ、酵素固定化ビーズを得た。

酵素固定化ビーズは、5°Cで、3000 rpm、10分間遠心沈降させ回収し、吸着緩衝液による再懸濁、再遠心回収を2回繰り返すことにより洗浄した。

## 〔実施例 4〕 固定化酵素の性質

pETN  $\alpha$  427、pETC  $\alpha$  427、pETC  $\beta$  427 形質転換大腸菌からの可溶化酵素液を吸着、回収、洗浄した固定化ビーズのアシラーゼ活性を測定した。

グルタリル-7ACA (基質) 末を、0.15 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.7) に 10 mg / mL の濃度に溶解し、酵素固定化ビーズ液を、約 1~3 U / mL の活性になるように調製した。小試験管内で、37°C、約 5 分間ブレインキュベートした基質液 0.9 mL に酵素固定化ビーズ液 0.1 mL を添加混合し、37°C で 5 分間反応した。時間経過後、1 mL の 4% 酢酸を添加し、反応を停止させ、イオン交換水でさらに 3 倍に希釈後、HPLC にて以下の条件で 7ACA 濃度を定量した。

## 7ACA HPLC 定量法

カラム : ODS (Lichrospher RP-18) 5  $\mu$ m 4  $\phi$   $\times$  250 mm

移動相 : 5 mM ヘキサンスルホン酸ナトリウム

0.1 M クエン酸

14.4% アセトニトリル

希釈液 : 0.05 M クエン酸-0.1 M リン酸 2 ナトリウム緩衝液 (pH 3.0)

流量 : 1.1 mL / min.

検出 : UV 254 nm

注入量 : 5  $\mu$ L

生成した 7ACA の量から、活性計算式「7ACA 濃度 ( $\mu$ g / mL)  $\times$  6  $\times$  10 / 5 / 272.4  $\times$  酵素液調製時希釈倍数」により酵素活性を測定した。ここで "6" は反応後希釈倍数、"10" は反応時酵素液希釈倍数、"5" は反応時間 (min.)、"272.4" 7ACA 分子量を表す。

その結果、pETN  $\alpha$  427、pETC  $\alpha$  427、pETC  $\beta$  427 形質転換大腸菌からの可溶化酵素液を吸着、回収、洗浄した固定化ビーズでは、約 0.9 / mg-dry ビーズの活性が確認された一方で、pETSS427 形質転換大腸菌からの固定化ビーズでは、活性は確認されなかった (表 1)。また、固定化する前の酵素可溶化溶液を用いて同様の活性

測定を行った結果、酵素の発現活性は、キチンビーズへの吸着の前後でほとんど変化しないことも分かった。

表 1

キチンビーズへの結合能	
	U / mg-dryビーズ
pETSS427	0
pETN $\alpha$ 427	0.86
pETC $\beta$ 427	0.86
pETC $\alpha$ 427	0.85

各形質転換大腸菌からの可溶化酵素液を、抗C427 GL-7ACAアシラーゼポリクローナル抗体を含むウサギ血清を用いたウエスタンブロッティング法により検出したところ、pETN $\alpha$ 427、pETC $\alpha$ 427、および pETC $\beta$ 427 形質転換大腸菌の発現酵素では、C427 GL-7ACAアシラーゼの $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖とCBDの連結が予想できるバンドのシフトがそれぞれ確認されたが、pETSS427 形質転換大腸菌の場合では、バンドのシフトは確認されなかった（図2）。

このことから、キチンビーズへの吸着は、C427 GL-7ACAアシラーゼに連結したCBDの働きによるものであることが明らかとなった。

さらに、固定化ビーズを、SDS-PAGEサンプル緩衝液で直接処理し、SDS-PAGE分析を行ったところ、高純度に精製されていることが確認された（図3）。

また、宿主大腸菌が並産する、基質、生成物の分解触媒作用を示す $\beta$ ラクタマーゼ活性を測定した。まず、30 mL の培養液から回収した菌体を破碎し、20 mM Tris-HCl 緩衝液 pH 8.5、500 mM NaCl、0.1 % Triton X-100（吸着緩衝液）1 mL で抽出した可溶化酵素液を培養液サンプルとした。この可溶化酵素液 1 mL を用いて、GL-7ACAアシラーゼ活性が 0.5 U/mg-dryビーズとなるようにキチンビーズに固定化した。これを吸着緩衝液 1 mL に懸濁して、固定化後サンプルとした。次に、7ACA（基質）末を、0.15 M リン酸緩衝液 pH 8.0 に10 mg / mLの濃度になるよう溶解して、これを基質液とした。基質液 9 mLに対して、培養液サンプルま

たは固定化後サンプルまたはブランクとして吸着緩衝液を 1 mL 添加混合し、25°C で120分間振盪反応した。時間経過後、反応液 0.25 mLを 1 mLの 4%酢酸溶液に添加し、反応を停止させ、イオン交換水で、これを 20 mLまでメスアップした。7ACA濃度をHPLCにて上記と同様に定量し、分解した7ACAの量から、活性計算式「(ブランク7ACA濃度( $\mu\text{g} / \text{ml}$ )) - サンプル7ACA濃度( $\mu\text{g} / \text{ml}$ )) / 120 / 272.4  $\times$  80  $\times$  10 / 30」により酵素活性を測定した。ここで、"120" は反応時間(min.)、"272.4" は7ACA分子量、"80" は反応後希釈倍数、"10" は反応時サンプル希釈倍数、"30" は培養液に対するサンプル調整時濃縮倍数を表す。

その結果、酵素固定化ビーズ液中に  $\beta$ ラクタマーゼ活性は認められず、C427 GL-7ACAアシラーゼが高純度に精製されていることが判明した (表 2)。

表 2

$\beta$ ラクタマーゼ活性 (mU / ml)		
	培養液	固定化後
pETN $\alpha$ 427	0.88	< 0.10
pETC $\beta$ 427	1.31	< 0.10
pETC $\alpha$ 427	1.56	< 0.10

#### [実施例 5] CBD融合環状リボペプチドアシラーゼ発現形質転換体の構築

*Streptomyces* sp. No. 6907株 (FERM BP-5809 ; W097/32975号公報 ; 当該株は通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号) に寄託されている、原寄託日平成 8 年 3 月 8 日、国際寄託日 (移管) 平成 9 年 2 月 3 日) 由来のFR901379アシラーゼ (W097/32975号公報参照 ; 本発明において *Streptomyces* sp. No. 6907株由来の当該アシラーゼを「TA6907アシラーゼ」とも称す) のC末端側にバシルス・サーキュランス由来のCBDが連結された蛋白質を、放線菌を宿主として発現するプラスミドを構築する。TA6907アシラーゼとCBDとは Kpn I サイトで連結する。

CBDとして、ペプチド精製用に用いられる IMPACT™ T7 system (New England

Biolabs社製)の発現用プラスミドであるpTYB2のCBDコード領域より、プライマー14(配列番号:23)、およびプライマー15(配列番号:24)を用いたPCR反応により、約150bpの断片を増幅する。増幅された断片の5'末端にはKpn Iサイト、3'末端には、終止コドンとBam HIサイトが導入されている。pSB(W097/32975号公報参照)中のTA6907アシラーゼコード領域より、ユニークサイトであるNot Iサイトから3'末端までの約900bpの断片を、プライマー16(配列番号:25)および17(配列番号:26)を用いたPCR反応により増幅する。増幅された断片の3'末端にはKpn Iサイトが導入されている。

pSBをNot IおよびBam HIで消化し、約5000bpの断片を得る。増幅したCBD断片をBam HIとKpn I、TA6907アシラーゼの3'末端断片をKpn IおよびNot Iで消化し、得られる3つのDNA断片を3ピースライゲーションにより繋ぎ、pUAYCBDを得る(図4)。pUAYCBDのアシラーゼコード領域を含む Sac I サイトから Bam HI サイトまでの塩基配列を配列番号:27に、このDNAによりコードされるCBDを融合したTA6907アシラーゼの開始コドンと予想される953番目からの翻訳アミノ酸配列を配列番号:28に示す。配列番号:27の3371位~3526位(配列番号:28の807位~858位)がCBDに相当する。さらに、このプラスミドをSac IおよびBam HIで消化し、切り出した約3000bpの断片をSac IおよびBgl IIで消化した放線菌用ベクターpIJ702(W097/32975号公報参照)に組み込み、pJAYCBDを得る(図5)。

「Genetic Manipulation of Streptomyces. A Laboratory Manual. The John Innes Foundation, Norwich, UK, 1985.」に記載されている方法に従って、ストレプトマイセス・リビダンス 1326株(J. General Microbiology 1983, 129, 2703-2713)をpJAYCBDで形質転換する。得られた形質転換株のうち1株を選択し、ストレプトマイセス・リビダンス 1326/pJAYCBDとする。

#### プライマー配列

用いたプライマー配列を以下に示す。

プライマー-1 (センス) CBDKp5 : 5'-AAGCCAGGTACCACGACAAATCC-3' (配列番号 : 23)

プライマー-2 (アンチセンス) CBDBam3 : 5'-AATTCGGGATCCCTATTGAAGCTGCC-3' (配列番号 : 24)

プライマー-3 (センス) AcyNot5 : 5'-CCAATGCGGAGCGGCCGCTGACCGGGTACG-3' (配列番号 : 25)

プライマー-4 (アンチセンス) AcyKp3 : 5'-CCGCCCACCGGTACCCCGCCGCTCGTGCAC-3' (配列番号 : 26)

#### [実施例6] 形質転換株の培養およびFR901379アシラーゼの発現

5%シュクロース、1%グルコース、0.3%酵母エキス (Difco社)、0.5%バクトペプトン (Difco社)、0.3%肉エキス (Difco社)、5mM MgCl<sub>2</sub>、0.5%グリシン、50 µg/ml のチオストレプトン (pH 6.5) からなる培地 10ml を100ml容三角フラスコに入れ、形質転換株ストレプトマイセス・リビダンス1326/pJAYCBD の5mm角の菌体を植菌する。30°C、3日間 (260rpm) 培養し、その培養液のFR901379アシラーゼ活性を測定し、FR179642 (脱アシル化したFR901379物質) (いずれもW097/32975号公報参照) を生成する活性を確認する。

当該アシラーゼ活性は以下のようにして測定することができる。

#### <アシラーゼ活性の測定>

100mg/ml FR901379 (W097/32975号公報参照) 水溶液 0.1ml、リン酸緩衝液 (pH 6.0) 0.1ml、メタノール 0.1ml、蒸留水 0.6ml からなる溶液に、培養液もしくは、固定化酵素懸濁液 0.1ml を加え、37°C (125rpm) で反応させる。15分後、4%酢酸 1ml と蒸留水 2ml を添加することで、反応を終了させる。そして、生成したFR179642 (脱アシル化したFR901379物質) を高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いて、以下の条件で定量する。

カラム ; Kaseisorb LC PO Super (4.6 mm I.D. x 250 mm) (東京化成社)

カラム温度 ; 50°C

溶離液 ; 蒸留水 : メタノール : リン酸 = 960 : 40 : 1

流速 ; 1 ml/min

検出 ; UV-215 nm

### 〔実施例 7〕 酵素の調製とキチンビーズへの酵素固定化

#### (1) 発酵液の調製

500mL容フラスコに50mLのチオストレプトン (50 $\mu$ g/mL) を含むPM-1培地 (6% 日食#3600、3%脱脂大豆粉、0.5%CaCO<sub>3</sub>、0.005%チオストレプトン、pH無修正) を入れ、形質転換株ストレプトマイセス・リビダンス 1326/ pJAYCBD の 5mm 角の菌体を植菌した後、30°Cで3日間培養する。その 2.5mL を 50mL のSG培地 (8% マルトース、3%脱脂大豆粉、3%脱脂小麦胚芽、0.5%CaCO<sub>3</sub>、0.005%チオストレプトン、pH無修正) を入れた500mL容フラスコに植菌し、30°Cで3日間培養する。

#### (2) CBDを融合したFR901379アシラーゼのキチンビーズへの固定化

発酵液 24mL に 4M KClを8mL加え、4°Cで一晩放置した後、遠心 (10,000rpm, 10分間) により得られた上清をKCl抽出液とする。水に分散したキチンビーズ(New England BioLabs社製)に、酵素活性が 0.5~5 U の濃度となるように可溶化酵素液を添加する。これを、5°Cで、5時間以上振盪混合し、酵素をキチンビーズに吸着させる。酵素固定化ビーズは、5°Cで、3000rpm、10分間遠心沈降させ回収し、洗浄用緩衝液 (20mM Tris-HCl緩衝液 pH8.5、500mM NaCl、0.1% TritonX 100) による再懸濁、再遠心回収を2回繰り返すことにより洗浄する。

CBD融合アシラーゼは、キチンビーズに対して高い吸着活性を示す。高純度に精製されていることは、固定化ビーズを、SDS-PAGEサンプル緩衝液で直接処理し、SDS-PAGE分析を行うことで確認することができる。

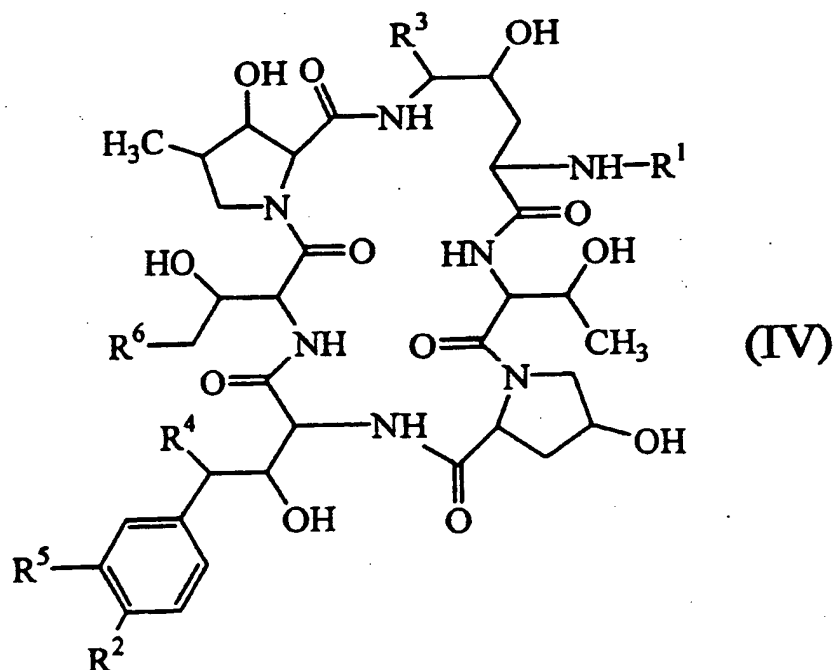
### 産業上の利用の可能性

本発明により、キチン・セルロース結合ドメインを融合させたヘテロマーペプチドが提供された。本発明により、工業的に有用であって、特異なプロセッシング機構を持つ酵素を、活性を保持したまま固定化することが可能となる。キチンやセルロースは工業的にも利用可能な担体であり、これに吸着能を示すキチン・セルロース結合ドメインを用いた本発明のヘテロマーペプチドは、工業的利用に適している。キチン・セルロース結合ドメインのキチン・セルロースへの吸着は特異的であるが故に、吸着した酵素は高純度に精製されている。従って、通常の酵素固定化技術に比べ、酵素の精製が不要であるという点でも優位である。特に、大腸菌中には、セファロ骨格の化合物を分解する酵素の $\beta$ ラクタマーゼが存在しており、従来の固定化酵素法では、この酵素の除去が不可欠であったが、本発明の方法では簡便に除去できる。また、従来のイオン交換担体への固定化法では、担体への基質、生成物の吸着により生成物収率が低下したが、本発明の固定化方法は基質、生成物の吸着はないため、高い収率で固定化ヘテロマーペプチドを調製することが可能である。



## 請求の範囲

1. 前駆体ペプチドの切断により生成されるヘテロマーペプチドを構成するサブユニットの少なくとも1つがキチン・セルロース結合ドメインを付加されているヘテロマーペプチド。
2. ヘテロマーペプチドが自己スプライシングによって生成される蛋白質である、請求項1に記載のペプチド。
3. 自己スプライシングによって生成される蛋白質がアミノアシラーゼである、請求項2に記載のペプチド。
4. アミノアシラーゼが $\gamma$ - $\beta$ -(4-カルボキシブタンアミド)-セファロスポラン酸アシラーゼである、請求項3に記載のペプチド。
5. 自己スプライシングによって生成される蛋白質が環状リボペプチドアシラーゼである、請求項2に記載のペプチド。
6. 環状リボペプチドアシラーゼが式：



(式中  $R^1$  はアシル基、 $R^2$  はヒドロキシ基またはアシルオキシ基、 $R^3$  は水素

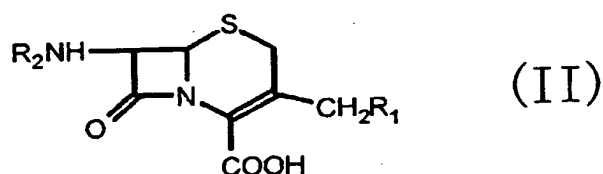
またはヒドロキシ基、 $R^4$  は水素またはヒドロキシ基、 $R^5$  は水素またはヒドロキシスルホニルオキシ基、および  $R^6$  は水素またはカルバモイル基を意味する) で示される化合物IVのアシル化を触媒するアシラーゼである、請求項5に記載のペプチド。

7. 請求項1に記載のヘテロマーペプチドの前駆体ペプチド。
8. 前駆体ペプチドが、以下の(a)、(b)、または(c)のいずれかのペプチドである請求項7に記載の前駆体ペプチド。
  - (a) 配列番号: 17、配列番号: 19、配列番号: 21、および配列番号: 28に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含むペプチド
  - (b) 配列番号: 17、配列番号: 19、配列番号: 21、および配列番号: 28に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれかのアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加したアミノ酸配列からなり、かつキチンまたはセルロースへの結合活性とアミノアシラーゼ活性を有するヘテロマーを構成することができるペプチド
  - (c) 配列番号: 16、配列番号: 18、配列番号: 20、および配列番号: 27に記載の塩基配列からなる群から選択されるいずれかの塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができるDNAによってコードされ、かつキチン・セルロースへの結合活性とアミノアシラーゼ活性を有するヘテロマーを構成することができるペプチド
9. 請求項8に記載の前駆体ペプチドをコードするDNA。
10. 請求項9に記載のDNAを含む発現ベクター。
11. 請求項10に記載の発現ベクターによって形質転換された宿主細胞。
12. 請求項11に記載の宿主細胞を培地で培養し、宿主細胞および/またはその培養上清からヘテロマーペプチドまたは該ヘテロマーペプチドの前駆体ペプチドを回収することを特徴とする、請求項1に記載のヘテロマーペプチドまた

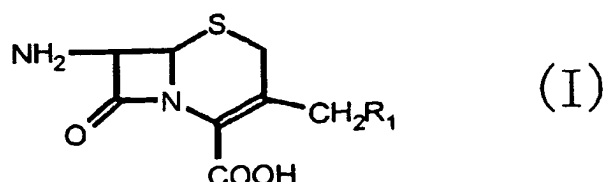
は該ヘテロマーペプチドの前駆体ペプチドの製造方法。

13. 請求項1に記載のヘテロマーペプチドまたは該ヘテロマーペプチドの前駆体ペプチドを、キチンおよび／またはセルロースに接触させる工程を含む、固定化ヘテロマーペプチドの製造方法。
14. 請求項1に記載のヘテロマーペプチドにおけるキチン・セルロース結合ドメインがキチンおよび／またはセルロースに結合している固定化ヘテロマーペプチド。
15. (a) 請求項14に記載の固定化ヘテロマーペプチドに、該ヘテロマーペプチドの基質を接触させる工程、および  
(b) 工程(a)における反応生成物を回収する工程、を含む、固定化ヘテロマーペプチドに触媒されて生じる反応生成物の製造方法。
16. 請求項4に記載のヘテロマーペプチドにおけるキチン・セルロース結合ドメインがキチンおよび／またはセルロースに結合している固定化ヘテロマーペプチドに、

式：



(式中、 $R_1$  はアセトキシ、ヒドロキシまたは水素、 $R_2$  は炭素数3～8のカルボキシアリカノイルまたはD-グルタミルを示す) で示される化合物 (II) またはその塩を接触させて、式：

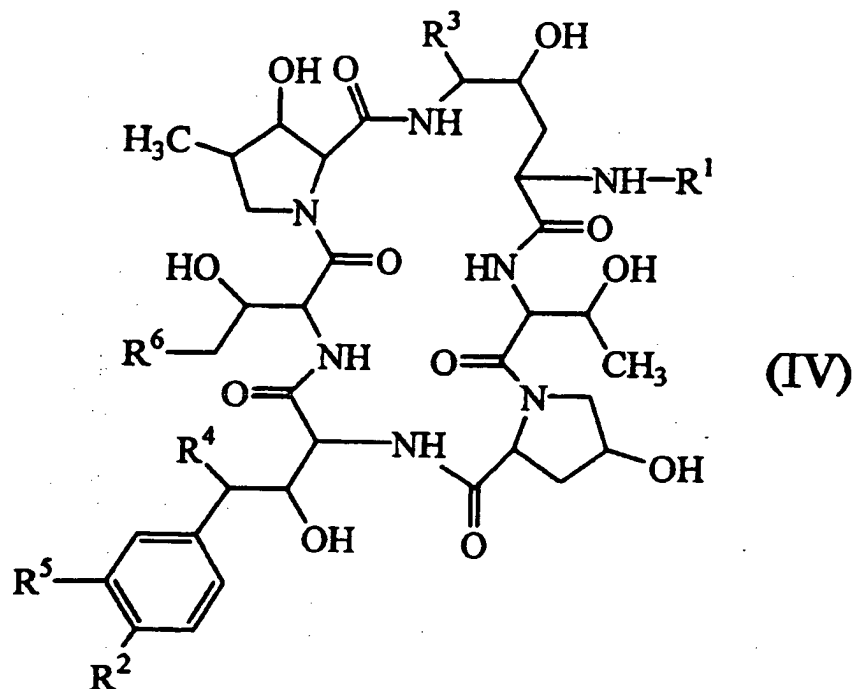


(式中、 $R_1$  はアセトキシ、ヒドロキシまたは水素を示す) で示される化合物

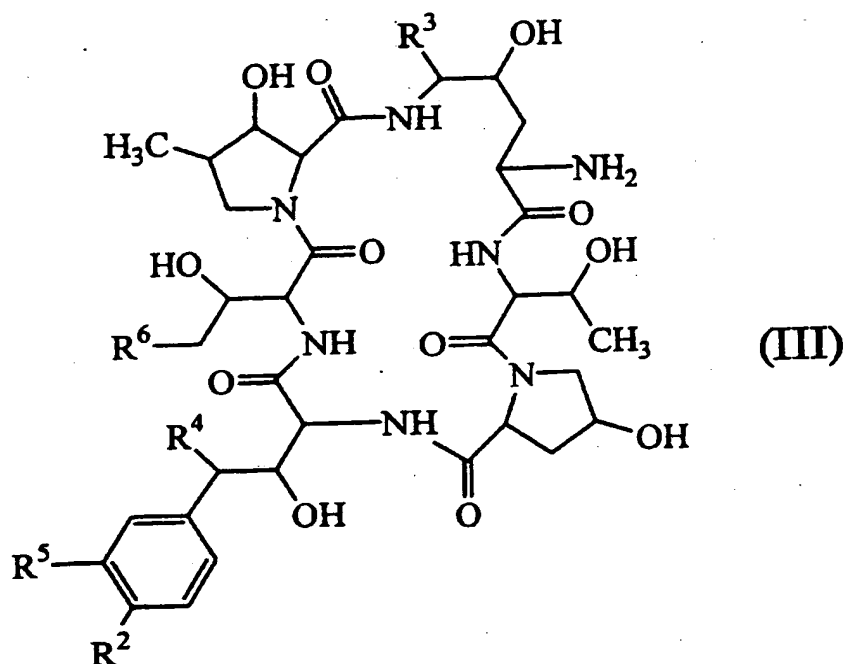
(I) またはその塩を得ることを特徴とする化合物 (I) の製造法。

17. 請求項 6 に記載のヘテロマーペプチドにおけるキチン・セルロース結合ドメインがキチンおよび/またはセルロースに結合している固定化ヘテロマーペプチドに、

式：



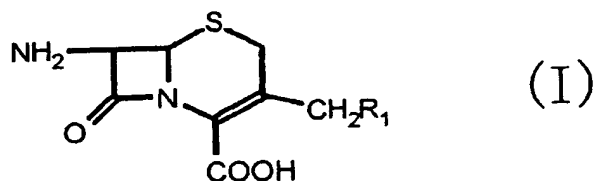
(式中  $R^1$  はアシル基、 $R^2$  はヒドロキシ基またはアシルオキシ基、 $R^3$  は水素またはヒドロキシ基、 $R^4$  は水素またはヒドロキシ基、 $R^5$  は水素またはヒドロキシスルホニルオキシ基、および  $R^6$  は水素またはカルバモイル基を意味する) で示される化合物 (IV) またはその塩を接触させて、式：



(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$  および  $R^6$  は前記と同じ基を意味する) で示される化合物 (III) またはその塩を得ることを特徴とする化合物 (III) の製造法。

18. 7- $\beta$ -(4-カルボキシブタンアミド)-セファロスポラン酸アシラーゼを構成するサブユニットの少なくとも1つにキチン・セルロース結合ドメインを付加し、該キチン・セルロース結合ドメインをキチンおよび/またはセルロースに固定化してなる、

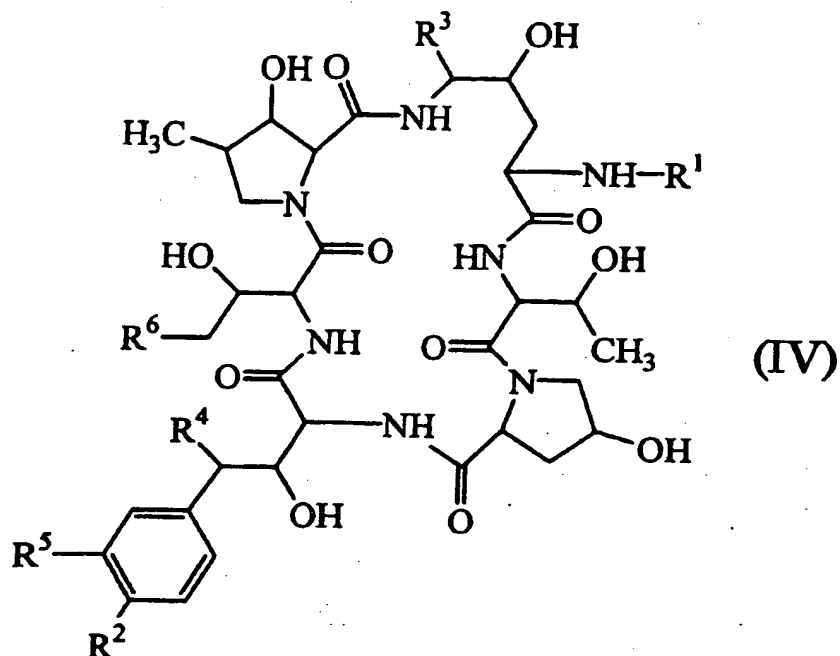
式：



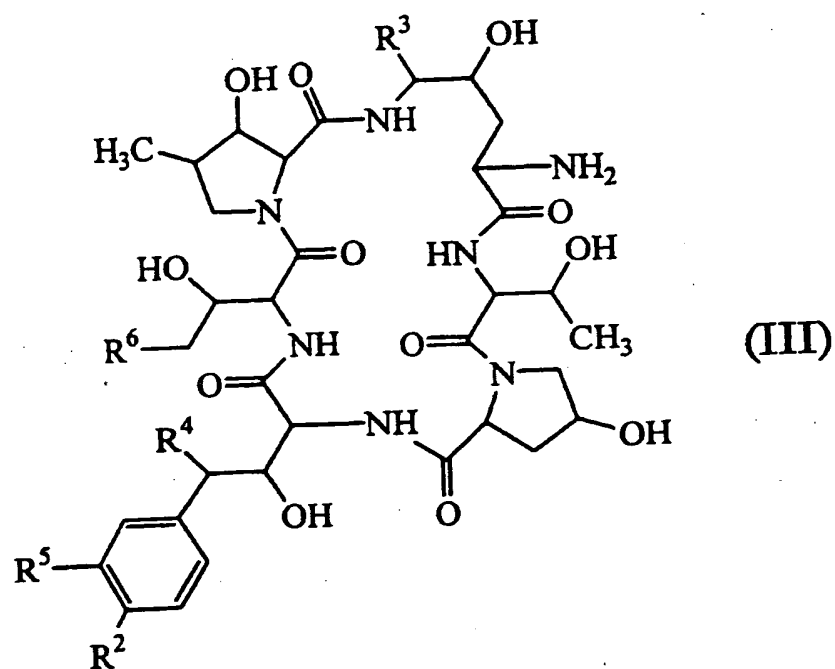
(式中、 $R_1$  はアセトキシ、ヒドロキシまたは水素を示す) で示される化合物

(I) 製造用の固定化酵素。

19. 式：



(式中  $R^1$  はアシル基、 $R^2$  はヒドロキシ基またはアシルオキシ基、 $R^3$  は水素またはヒドロキシ基、 $R^4$  は水素またはヒドロキシ基、 $R^5$  は水素またはヒドロキシスルホニルオキシ基、および  $R^6$  は水素またはカルバモイル基を意味する) で示される化合物 (IV) またはその塩のアシル化を触媒する環状リポペプチドアシラーゼを構成するサブユニットの少なくとも 1 つにキチン・セルロース結合ドメインを付加し、該キチン・セルロース結合ドメインをキチンおよび/またはセルロースに固定化してなる、式：



(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$  および  $R^6$  は前記と同じ基を意味する) で示される化合物 (III) 製造用の固定化酵素。

1/5

図 1

## C427-CBD フュージョンペプチドの発現プラスミドの構築

CBD ; セルロースまたはキチン結合ドメイン

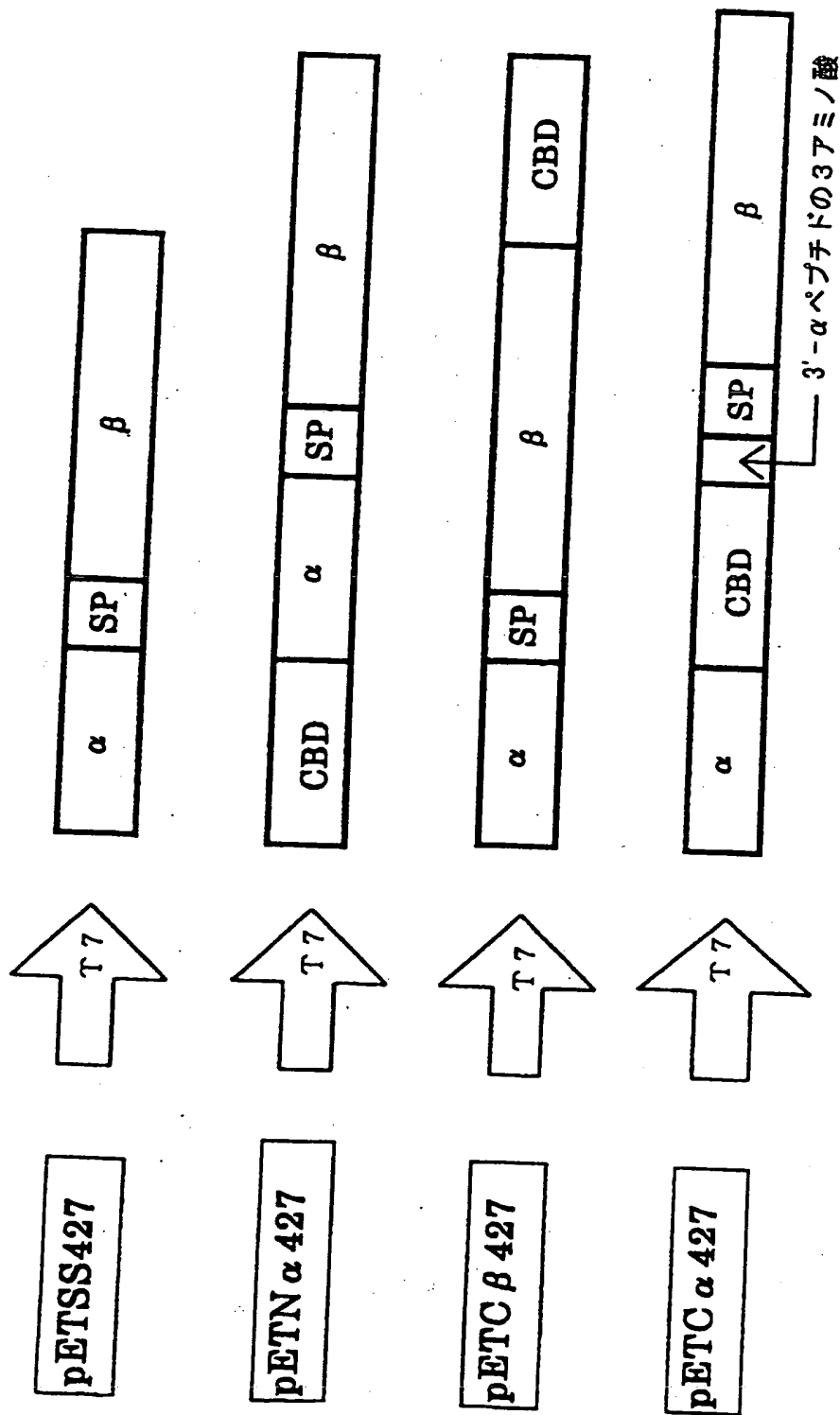
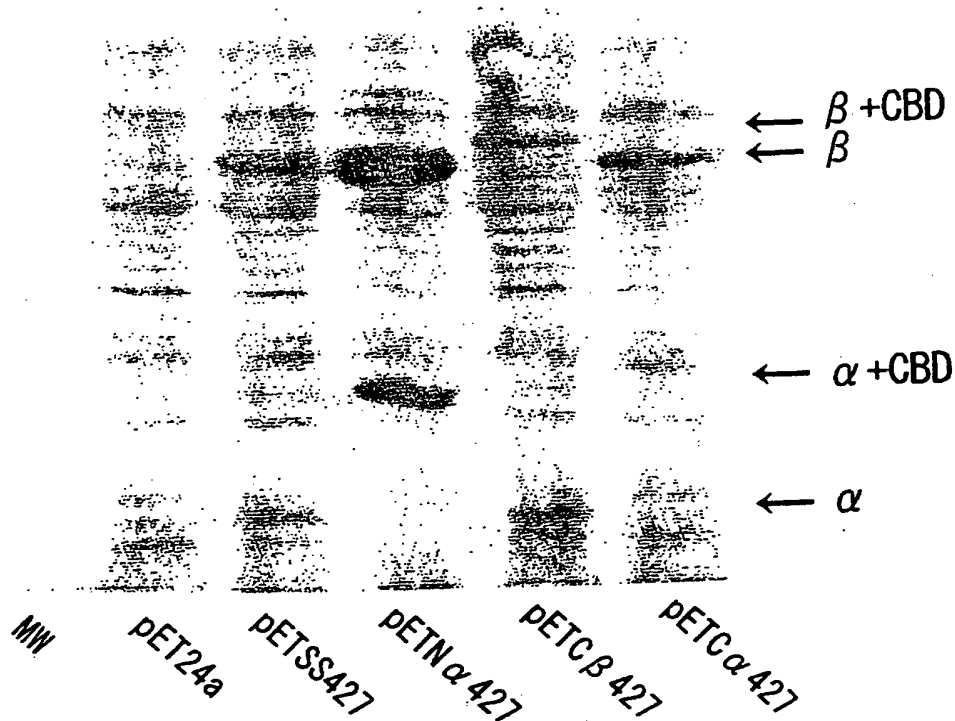


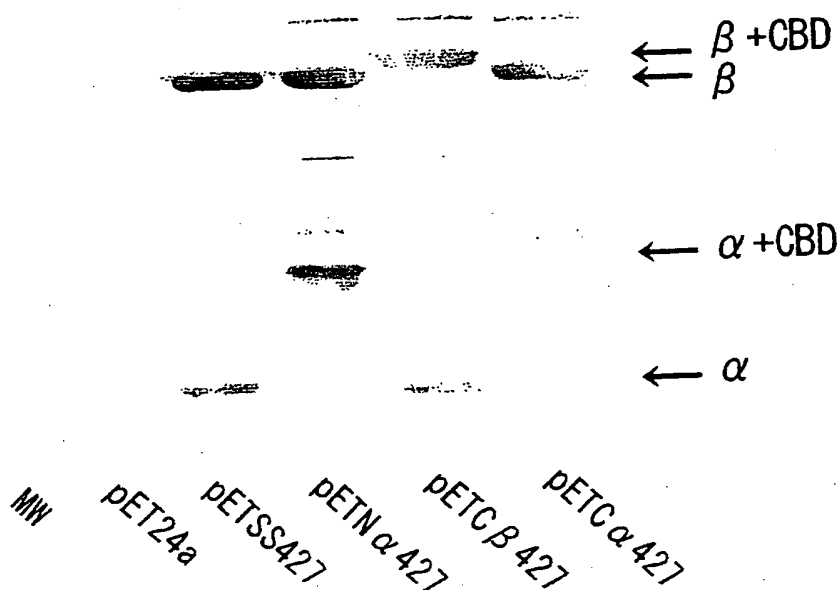


図 2

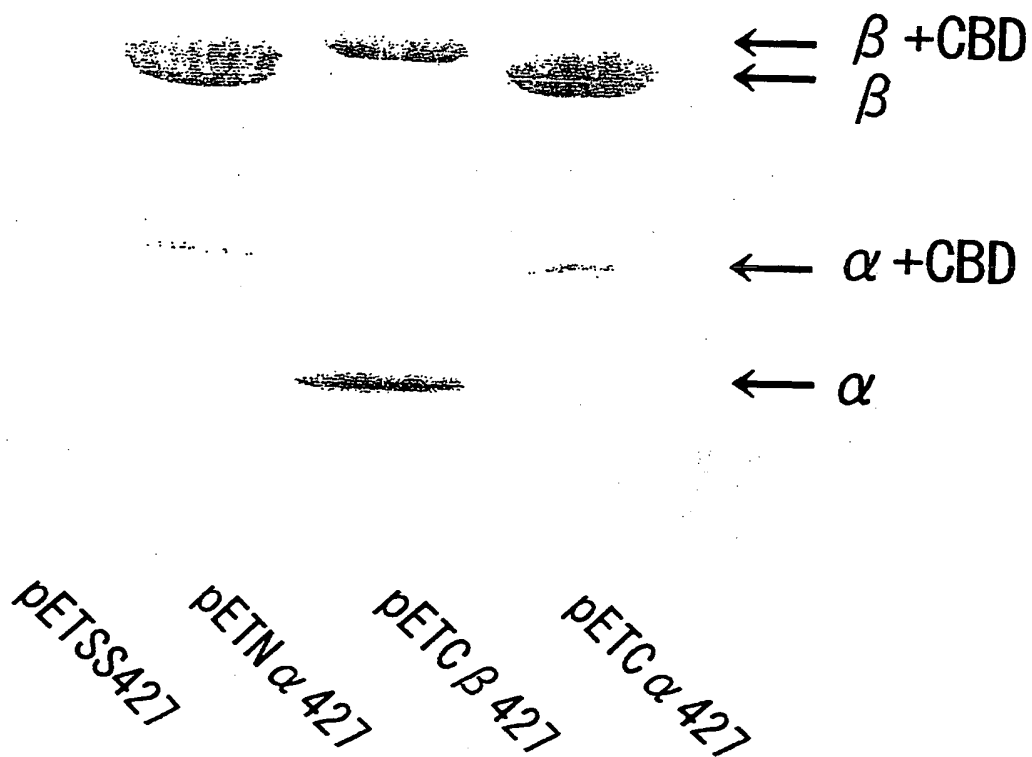
A



B



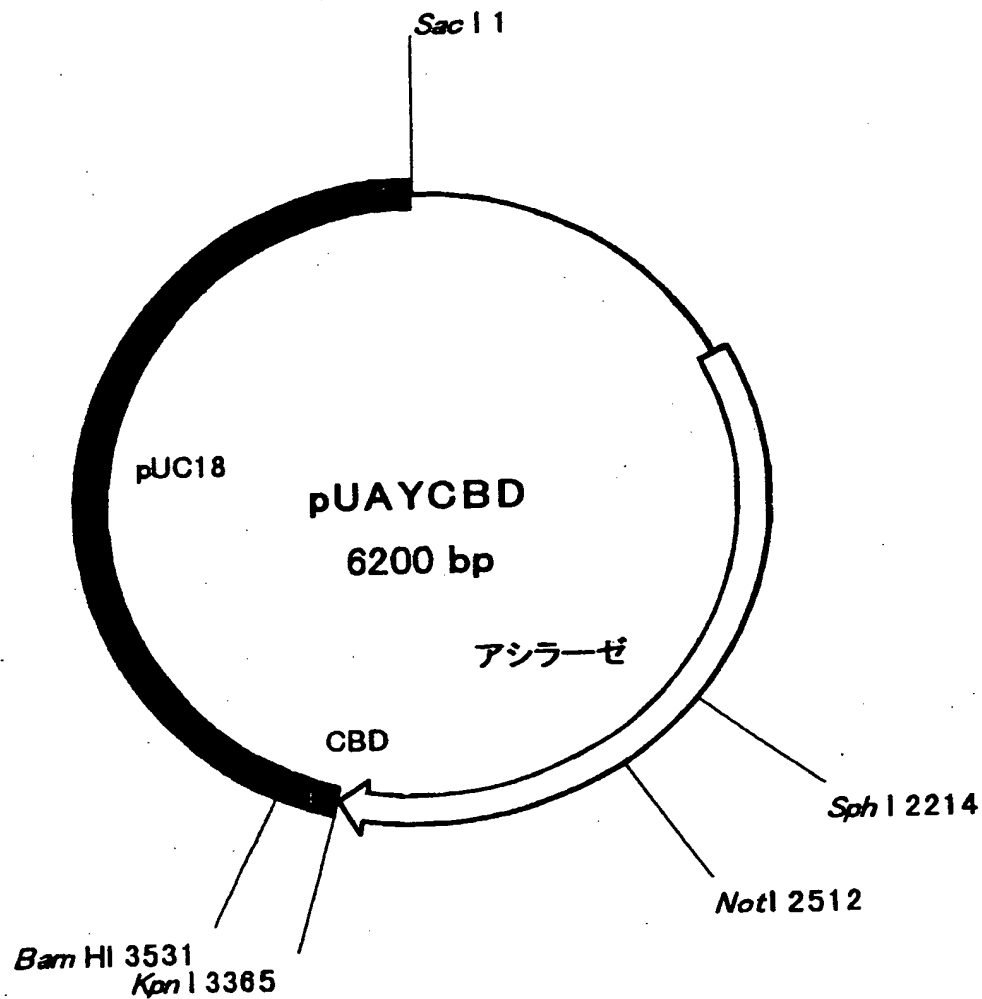
☒ 3



BEST AVAILABLE COPY

4 / 5

図 4

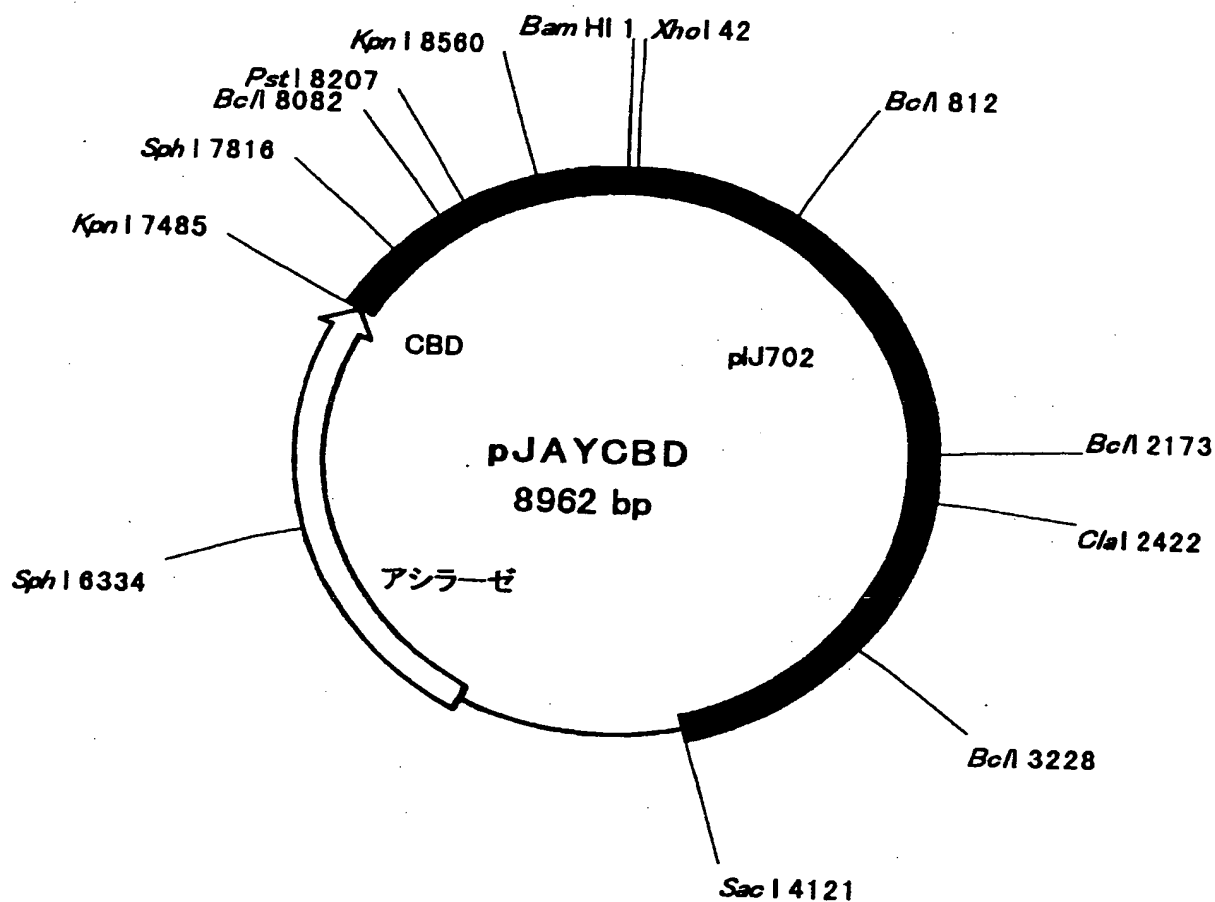


Plasmid name: pUAYCBD

Plasmid size: 6200 bp

5 / 5

図 5



Plasmid name: pJAYCBD

Plasmid size: 8962 bp

## SEQUENCE LISTING

<110> FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> Immobilization of Heteromer Peptide by Gene Engineering

<130> F3-104PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-301699

<151> 1999-10-22

<160> 28

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 1

gcgtcgccgg taccctggcc gagccga

27

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 2

cgcctcgtag taggtgaagt ag

22

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 3

tgaactcaca tatgacgaca aatcctggtg

30

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 4

ccttcctggg taccttgaag ctgccacaag

30

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 5

gcgtcgccgg taccctggcc gagccga

27

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 6

tgaactcagg taccacgaca aatcctggtg

30

<210> 7  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized primer sequence

<400> 7  
tcattgaagc tgccacaagg c

21

<210> 8  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized primer sequence

<400> 8  
atgagctacg gcaattctcg

20

<210> 9  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized primer sequence

<400> 9  
ggtcaggcgg taacctggct tgaagtt

27

<210> 10  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 10

ggcggggtcgg taccgcccag ggtgcggccg ggcgacgcga

40

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 11

gccgcaccgg taccgagggc gacccgccgg acctgg

36

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 12

ccgtgatcat gtcgaaatac tgctcg

26

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 13

taatacgact cactataggg

20

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 2078

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence



5/44

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificially  
 synthesized GL-7ACA acylase sequence

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(2078)

<400> 14  
 atg ctg gcc gag ccg acc tcg acg ccg cag gcg ccg att gcg gcc tat 48  
 Met Leu Ala Glu Pro Thr Ser Thr Pro Gln Ala Pro Ile Ala Ala Tyr  
 1 5 10 15

aaa ccg aga agc aat gag atc ctg tgg gac ggc tac ggc gtc ccg cac 96  
 Lys Pro Arg Ser Asn Glu Ile Leu Trp Asp Gly Tyr Gly Val Pro His  
 20 25 30

atc tac ggg gtc gac gcg ccc tca gcc ttc tac ggc tac ggc tgg gcc 144  
 Ile Tyr Gly Val Asp Ala Pro Ser Ala Phe Tyr Gly Tyr Gly Trp Ala  
 35 40 45

cag gcg cgc agc cac ggc gac aat atc ctg cgc ctg tat gga gaa gcg 192  
 Gln Ala Arg Ser His Gly Asp Asn Ile Leu Arg Leu Tyr Gly Glu Ala  
 50 55 60

cgg ggc aag ggg gcc gaa tac tgg ggc ccg gat tac gaa cag acg acc 240  
 Arg Gly Lys Gly Ala Glu Tyr Trp Gly Pro Asp Tyr Glu Gln Thr Thr  
 65 70 75 80

gtc tgg ctg ctg acc aac ggc gtg ccg gag cgc gcc cag cag tgg tat 288  
 Val Trp Leu Leu Thr Asn Gly Val Pro Glu Arg Ala Gln Gln Trp Tyr  
 85 90 95

gcg cag cag tcg cct gat ttc cgc gcc aac ctc gac gcc ttc gcg gcg 336  
 Ala Gln Gln Ser Pro Asp Phe Arg Ala Asn Leu Asp Ala Phe Ala Ala  
 100 105 110

ggc atc aac gcc tat gcg cag cag aac ccc gac gac atc tcg ccc gag 384  
 Gly Ile Asn Ala Tyr Ala Gln Gln Asn Pro Asp Asp Ile Ser Pro Glu  
 115 120 125

gtg cgg cag gtg ctg ccg gtc tcc ggc gcc gac gtg gtg gcc cac gcc 432  
 Val Arg Gln Val Leu Pro Val Ser Gly Ala Asp Val Val Ala His Ala  
 130 135 140

cat cgc ctg atg aac ttc ctc tat gtc gcg tcg ccc ggc cgc acc ctg 480  
 His Arg Leu Met Asn Phe Leu Tyr Val Ala Ser Pro Gly Arg Thr Leu  
 145 150 155 160

ggc gag ggc gac ccg ccg gac ctg gcc gat cag gga tcc aac tcc tgg 528  
 Gly Glu Gly Asp Pro Pro Asp Leu Ala Asp Gln Gly Ser Asn Ser Trp  
 165 170 175

gct gtg gcg ccg ggc aag acg gcc aat ggg aac gcc ctg ctg ctg cag 576  
 Ala Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Asn Gly Asn Ala Leu Leu Leu Gln  
 180 185 190

aac ccg cac ctg tcc tgg acg acg gac tac ttc acc tac tac gag gcg 624  
 Asn Pro His Leu Ser Trp Thr Thr Asp Tyr Phe Thr Tyr Tyr Glu Ala  
 195 200 205

cat ctc gtc acg ccg gac ttc gaa atc tat ggc gcg acc cag atc ggc 672  
 His Leu Val Thr Pro Asp Phe Glu Ile Tyr Gly Ala Thr Gln Ile Gly  
 210 215 220

ctg ccg gtc atc cgc ttc gcc ttc aat cag ccg atg ggc atc acc aat 720  
 Leu Pro Val Ile Arg Phe Ala Phe Asn Gln Arg Met Gly Ile Thr Asn  
 225 230 235 240

acc gtc aac ggc atg gtg ggg gcc acc aac tat ccg ctg acg ctt cag 768  
 Thr Val Asn Gly Met Val Gly Ala Thr Asn Tyr Arg Leu Thr Leu Gln  
 245 250 255

ggc gac ggc tat ctg tat gac ggt cag gtg ccg ccg ttc gag ccg cgt 816  
 Gly Asp Gly Tyr Leu Tyr Asp Gly Gln Val Arg Pro Phe Glu Arg Arg  
 260 265 270

cag gct tcg tat cgc ctg cgt cag gcg gac ggg tcg acg gtc gac aag 864  
 Gln Ala Ser Tyr Arg Leu Arg Gln Ala Asp Gly Ser Thr Val Asp Lys  
 275 280 285

ccg ttg gag atc cgt tcc agc gtc cat ggc ccg gtc ttc gag cgc gcg 912  
 Pro Leu Glu Ile Arg Ser Ser Val His Gly Pro Val Phe Glu Arg Ala  
 290 295 300

gac ggc acg gcc gtc gcc gtt ccg gtc gcc ggt ctg gat ccg ccg ggc 960  
 Asp Gly Thr Ala Val Ala Val Arg Val Ala Gly Leu Asp Arg Pro Gly  
 305 310 315 320

atg ctc gag cag tat ttc gac atg atc acg gcg gac agc ttc gac gac 1008  
 Met Leu Glu Gln Tyr Phe Asp Met Ile Thr Ala Asp Ser Phe Asp Asp  
 325 330 335

tac gaa gcc gct atg gcg ccg atg cag gtg ccg acc ttc aac atc gtc 1056  
 Tyr Glu Ala Ala Met Ala Arg Met Gln Val Pro Thr Phe Asn Ile Val  
 340 345 350

7/44

tac gcc gac cgc gaa ggg acc atc aac tac agc ttc acg gcg tgg cgc Tyr Ala Asp Arg Glu Gly Thr Ile Asn Tyr Ser Phe Thr Ala Trp Arg 355 360 365	1104
cca aac ggg ccg agg gcg aca tcg cct tct ggc agg ggc tcg gcc ggg Pro Asn Gly Pro Arg Ala Thr Ser Pro Ser Gly Arg Gly Ser Ala Gly 370 375 380	1152
cga ttc ctc gcg tta ctg tgg act gag aca cac ccc tgg acg atc tgc Arg Phe Leu Ala Leu Trp Thr Glu Thr His Pro Trp Thr Ile Cys 385 390 395 400	1200
cgc gcg tca cca atc cgc cgg gcc gct tcg tgc aga act cca atg atc Arg Ala Ser Pro Ile Arg Arg Ala Ala Ser Cys Arg Thr Pro Met Ile 405 410 415	1248
cgc cgt gga cgc cga cct ggc ccg tca cct aca cgc cca ggg act tcc Arg Arg Gly Arg Arg Pro Gly Pro Ser Pro Thr Arg Pro Gly Thr Ser 420 425 430	1296
cct cct atc tgg cgc ccc aga cgc gca ctc cct gcg cgc tca gca aag Pro Pro Ile Trp Arg Pro Arg Arg Ala Leu Pro Ala Arg Ser Ala Lys 435 440 445	1344
cgt gcg tct gat gtc gag aac gac gac ctg acg ctg gaa cgc ttc atg Arg Ala Ser Asp Val Glu Asn Asp Asp Leu Thr Leu Glu Arg Phe Met 450 455 460	1392
gcg ctg cag ttg agc cac cgc gcc gtc atg gcc gac cgc acc ttg ccg Ala Leu Gln Leu Ser His Arg Ala Val Met Ala Asp Arg Thr Leu Pro 465 470 475 480	1440
gac ctg atc ccg gcc gcc ctg atc gac ccc gat ccc gag gtc cag gcg Asp Leu Ile Pro Ala Ala Leu Ile Asp Pro Asp Pro Glu Val Gln Ala 485 490 495	1488
gcg gcg cgc ctg ctg gcg gcg tgg gat cgt gag ttc acc agc gac agc Ala Ala Arg Leu Leu Ala Ala Trp Asp Arg Glu Phe Thr Ser Asp Ser 500 505 510	1536
cgc gcc gcc ctg ctg ttc gag gaa tgg gcg cgt ctg ttc gcc ggc cag Arg Ala Ala Leu Leu Phe Glu Glu Trp Ala Arg Leu Phe Ala Gly Gln 515 520 525	1584
aat ttc gcc ggc cag gcg ggt ttc gcc acg ccc tgg tcg ctg gat aag Asn Phe Ala Gly Gln Ala Gly Phe Ala Thr Pro Trp Ser Leu Asp Lys 530 535 540	1632

8/44

ccg gtc agc acc ccc tac ggc gtc cgc gac ccc aag gcc gcc gtc gat Pro Val Ser Thr Pro Tyr Gly Val Arg Asp Pro Lys Ala Ala Val Asp 545 550 555 560	1680
caa ctg cgg acc gcc atc gcc aac acc aag cgc aaa tac ggc gcg atc Gln Leu Arg Thr Ala Ile Ala Asn Thr Lys Arg Lys Tyr Gly Ala Ile 565 570 575	1728
gac cgg ccg ttc ggc gac gcc tcg cgc atg atc ctg aac gat gtg att Asp Arg Pro Phe Gly Asp Ala Ser Arg Met Ile Leu Asn Asp Val Ile 580 585 590	1776
gtt ccg ggc gcc gcc ggc tac ggc aac ctg ggt tcc ttc cgg gtc ttc Val Pro Gly Ala Ala Gly Tyr Gly Asn Leu Gly Ser Phe Arg Val Phe 595 600 605	1824
acc tgg tcc gat cct gac gaa aac ggg gtt cgc acg ccc gtc cac ggc Thr Trp Ser Asp Pro Asp Glu Asn Gly Val Arg Thr Pro Val His Gly 610 615 620	1872
gag acg tgg gtg gcg atg atc gag ttc tcc acc ccg gtg cgg gcc tat Glu Thr Trp Val Ala Met Ile Glu Phe Ser Thr Pro Val Arg Ala Tyr 625 630 635 640	1920
ggc ctg atg agc tac ggc aat tct cgc cag ccg ggc acg acg cac tac Gly Leu Met Ser Tyr Gly Asn Ser Arg Gln Pro Gly Thr Thr His Tyr 645 650 655	1968
agc gat cag atc gaa cgc gtg tcg cgg gcc gac ttc cgc gag ctg ttg Ser Asp Gln Ile Glu Arg Val Ser Arg Ala Asp Phe Arg Glu Leu Leu 660 665 670	2016
ctg cgg cga gag cag gtc gag gcc gcc gtc cag gaa cgc acg ccc ttc Leu Arg Arg Glu Gln Val Glu Ala Ala Val Gln Glu Arg Thr Pro Phe 675 680 685	2064
aac ttc aag cct ag Asn Phe Lys Pro 690	2078

<210> 15  
 <211> 692  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<400> 15

9/44

Met Leu Ala Glu Pro Thr Ser Thr Pro Gln Ala Pro Ile Ala Ala Tyr  
 1 5 10 15  
 Lys Pro Arg Ser Asn Glu Ile Leu Trp Asp Gly Tyr Gly Val Pro His  
 20 25 30  
 Ile Tyr Gly Val Asp Ala Pro Ser Ala Phe Tyr Gly Tyr Gly Trp Ala  
 35 40 45  
 Gln Ala Arg Ser His Gly Asp Asn Ile Leu Arg Leu Tyr Gly Glu Ala  
 50 55 60  
 Arg Gly Lys Gly Ala Glu Tyr Trp Gly Pro Asp Tyr Glu Gln Thr Thr  
 65 70 75 80  
 Val Trp Leu Leu Thr Asn Gly Val Pro Glu Arg Ala Gln Gln Trp Tyr  
 85 90 95  
 Ala Gln Gln Ser Pro Asp Phe Arg Ala Asn Leu Asp Ala Phe Ala Ala  
 100 105 110  
 Gly Ile Asn Ala Tyr Ala Gln Gln Asn Pro Asp Asp Ile Ser Pro Glu  
 115 120 125  
 Val Arg Gln Val Leu Pro Val Ser Gly Ala Asp Val Val Ala His Ala  
 130 135 140  
 His Arg Leu Met Asn Phe Leu Tyr Val Ala Ser Pro Gly Arg Thr Leu  
 145 150 155 160  
 Gly Glu Gly Asp Pro Pro Asp Leu Ala Asp Gln Gly Ser Asn Ser Trp  
 165 170 175  
 Ala Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Asn Gly Asn Ala Leu Leu Leu Gln  
 180 185 190  
 Asn Pro His Leu Ser Trp Thr Thr Asp Tyr Phe Thr Tyr Tyr Glu Ala  
 195 200 205  
 His Leu Val Thr Pro Asp Phe Glu Ile Tyr Gly Ala Thr Gln Ile Gly  
 210 215 220  
 Leu Pro Val Ile Arg Phe Ala Phe Asn Gln Arg Met Gly Ile Thr Asn  
 225 230 235 240  
 Thr Val Asn Gly Met Val Gly Ala Thr Asn Tyr Arg Leu Thr Leu Gln  
 245 250 255

10/44

Gly Asp Gly Tyr Leu Tyr Asp Gly Gln Val Arg Pro Phe Glu Arg Arg  
                   260                                  265                                  270

Gln Ala Ser Tyr Arg Leu Arg Gln Ala Asp Gly Ser Thr Val Asp Lys  
                   275                                  280                                  285

Pro Leu Glu Ile Arg Ser Ser Val His Gly Pro Val Phe Glu Arg Ala  
                   290                                  295                                  300

Asp Gly Thr Ala Val Ala Val Arg Val Ala Gly Leu Asp Arg Pro Gly  
                   305                                  310                                  315                                  320

Met Leu Glu Gln Tyr Phe Asp Met Ile Thr Ala Asp Ser Phe Asp Asp  
                                   325                                  330                                  335

Tyr Glu Ala Ala Met Ala Arg Met Gln Val Pro Thr Phe Asn Ile Val  
                   340                                  345                                  350

Tyr Ala Asp Arg Glu Gly Thr Ile Asn Tyr Ser Phe Thr Ala Trp Arg  
                   355                                  360                                  365

Pro Asn Gly Pro Arg Ala Thr Ser Pro Ser Gly Arg Gly Ser Ala Gly  
                   370                                  375                                  380

Arg Phe Leu Ala Leu Leu Trp Thr Glu Thr His Pro Trp Thr Ile Cys  
                   385                                  390                                  395                                  400

Arg Ala Ser Pro Ile Arg Arg Ala Ala Ser Cys Arg Thr Pro Met Ile  
                                   405                                  410                                  415

Arg Arg Gly Arg Arg Pro Gly Pro Ser Pro Thr Arg Pro Gly Thr Ser  
                   420                                  425                                  430

Pro Pro Ile Trp Arg Pro Arg Arg Ala Leu Pro Ala Arg Ser Ala Lys  
                   435                                  440                                  445

Arg Ala Ser Asp Val Glu Asn Asp Asp Leu Thr Leu Glu Arg Phe Met  
                   450                                  455                                  460

Ala Leu Gln Leu Ser His Arg Ala Val Met Ala Asp Arg Thr Leu Pro  
                   465                                  470                                  475                                  480

Asp Leu Ile Pro Ala Ala Leu Ile Asp Pro Asp Pro Glu Val Gln Ala  
                                   485                                  490                                  495

Ala Ala Arg Leu Leu Ala Ala Trp Asp Arg Glu Phe Thr Ser Asp Ser  
                   500                                  505                                  510

11/44

Arg Ala Ala Leu Leu Phe Glu Glu Trp Ala Arg Leu Phe Ala Gly Gln  
           515                                  520                                  525  
 Asn Phe Ala Gly Gln Ala Gly Phe Ala Thr Pro Trp Ser Leu Asp Lys  
           530                                  535                                  540  
 Pro Val Ser Thr Pro Tyr Gly Val Arg Asp Pro Lys Ala Ala Val Asp  
           545                                  550                                  555                                  560  
 Gln Leu Arg Thr Ala Ile Ala Asn Thr Lys Arg Lys Tyr Gly Ala Ile  
                                   565                                  570                                  575  
 Asp Arg Pro Phe Gly Asp Ala Ser Arg Met Ile Leu Asn Asp Val Ile  
                                   580                                  585                                  590  
 Val Pro Gly Ala Ala Gly Tyr Gly Asn Leu Gly Ser Phe Arg Val Phe  
                                   595                                  600                                  605  
 Thr Trp Ser Asp Pro Asp Glu Asn Gly Val Arg Thr Pro Val His Gly  
           610                                  615                                  620  
 Glu Thr Trp Val Ala Met Ile Glu Phe Ser Thr Pro Val Arg Ala Tyr  
           625                                  630                                  635                                  640  
 Gly Leu Met Ser Tyr Gly Asn Ser Arg Gln Pro Gly Thr Thr His Tyr  
                                   645                                  650                                  655  
 Ser Asp Gln Ile Glu Arg Val Ser Arg Ala Asp Phe Arg Glu Leu Leu  
                                   660                                  665                                  670  
 Leu Arg Arg Glu Gln Val Glu Ala Ala Val Gln Glu Arg Thr Pro Phe  
           675                                  680                                  685  
 Asn Phe Lys Pro  
           690

<210> 16  
 <211> 2241  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificially  
 synthesized CBD-fused GL-7ACA acylase sequence

<220>  
 <221> CDS

12/44

&lt;222&gt; (1)..(2241)

&lt;400&gt; 16

atg acg aca aat cct ggt gta tcc gct tgg cag gtc aac aca gct tat	48
Met Thr Thr Asn Pro Gly Val Ser Ala Trp Gln Val Asn Thr Ala Tyr	
1 5 10 15	
act gcg gga caa ttg gtc aca tat aac ggc aag acg tat aaa tgt ttg	96
Thr Ala Gly Gln Leu Val Thr Tyr Asn Gly Lys Thr Tyr Lys Cys Leu	
20 25 30	
cag ccc cac acc tcc ttg gca gga tgg gaa cca tcc aac gtt cct gcc	144
Gln Pro His Thr Ser Leu Ala Gly Trp Glu Pro Ser Asn Val Pro Ala	
35 40 45	
ttg tgg cag ctt caa ggt acc ctg gcc gag ccg acc tcg acg ccg cag	192
Leu Trp Gln Leu Gln Gly Thr Leu Ala Glu Pro Thr Ser Thr Pro Gln	
50 55 60	
gcg ccg att gcg gcc tat aaa ccg aga agc aat gag atc ctg tgg gac	240
Ala Pro Ile Ala Ala Tyr Lys Pro Arg Ser Asn Glu Ile Leu Trp Asp	
65 70 75 80	
ggc tac gcg gtc ccg cac atc tac ggg gtc gac gcg ccc tca gcc ttc	288
Gly Tyr Gly Val Pro His Ile Tyr Gly Val Asp Ala Pro Ser Ala Phe	
85 90 95	
tac ggc tac ggc tgg gcc cag gcg cgc agc cac ggc gac aat atc ctg	336
Tyr Gly Tyr Gly Trp Ala Gln Ala Arg Ser His Gly Asp Asn Ile Leu	
100 105 110	
cgc ctg tat gga gaa gcg cgg ggc aag ggg gcc gaa tac tgg ggc ccg	384
Arg Leu Tyr Gly Glu Ala Arg Gly Lys Gly Ala Glu Tyr Trp Gly Pro	
115 120 125	
gat tac gaa cag acg acc gtc tgg ctg ctg acc aac ggc gtg ccg gag	432
Asp Tyr Glu Gln Thr Thr Val Trp Leu Leu Thr Asn Gly Val Pro Glu	
130 135 140	
cgc gcc cag cag tgg tat gcg cag cag tcg cct gat ttc cgc gcc aac	480
Arg Ala Gln Gln Trp Tyr Ala Gln Gln Ser Pro Asp Phe Arg Ala Asn	
145 150 155 160	
ctc gac gcc ttc gcg gcg ggc atc aac gcc tat gcg cag cag aac ccc	528
Leu Asp Ala Phe Ala Ala Gly Ile Asn Ala Tyr Ala Gln Gln Asn Pro	
165 170 175	
gac gac atc tcg ccc gag gtg cgg cag gtg ctg ccg gtc tcc ggc gcc	576



13/44

Asp	Asp	Ile	Ser	Pro	Glu	Val	Arg	Gln	Val	Leu	Pro	Val	Ser	Gly	Ala		
			180					185					190				
gac	gtg	gtg	gcc	cac	gcc	cat	cgc	ctg	atg	aac	ttc	ctc	tat	gtc	gcg		624
Asp	Val	Val	Ala	His	Ala	His	Arg	Leu	Met	Asn	Phe	Leu	Tyr	Val	Ala		
			195				200					205					
tcg	ccc	ggc	cgc	acc	ctg	ggc	gag	ggc	gac	ccg	ccg	gac	ctg	gcc	gat		672
Ser	Pro	Gly	Arg	Thr	Leu	Gly	Glu	Gly	Asp	Pro	Pro	Asp	Leu	Ala	Asp		
			210			215					220						
cag	gga	tcc	aac	tcc	tgg	gct	gtg	gcg	ccg	ggc	aag	acg	gcc	aat	ggg		720
Gln	Gly	Ser	Asn	Ser	Trp	Ala	Val	Ala	Pro	Gly	Lys	Thr	Ala	Asn	Gly		
					230					235					240		
aac	gcc	ctg	ctg	ctg	cag	aac	ccg	cac	ctg	tcc	tgg	acg	acg	gac	tac		768
Asn	Ala	Leu	Leu	Leu	Gln	Asn	Pro	His	Leu	Ser	Trp	Thr	Thr	Asp	Tyr		
					245				250					255			
ttc	acc	tac	tac	gag	gcg	cat	ctc	gtc	acg	ccg	gac	ttc	gaa	atc	tat		816
Phe	Thr	Tyr	Tyr	Glu	Ala	His	Leu	Val	Thr	Pro	Asp	Phe	Glu	Ile	Tyr		
					260			265					270				
ggc	gcg	acc	cag	atc	ggc	ctg	ccg	gtc	atc	cgc	ttc	gcc	ttc	aat	cag		864
Gly	Ala	Thr	Gln	Ile	Gly	Leu	Pro	Val	Ile	Arg	Phe	Ala	Phe	Asn	Gln		
			275				280					285					
cgg	atg	ggc	atc	acc	aat	acc	gtc	aac	ggc	atg	gtg	ggg	gcc	acc	aac		912
Arg	Met	Gly	Ile	Thr	Asn	Thr	Val	Asn	Gly	Met	Val	Gly	Ala	Thr	Asn		
			290			295					300						
tat	cgg	ctg	acg	ctt	cag	ggc	gac	ggc	tat	ctg	tat	gac	ggg	cag	gtg		960
Tyr	Arg	Leu	Thr	Leu	Gln	Gly	Asp	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Asp	Gly	Gln	Val		
					310					315					320		
cgg	ccg	ttc	gag	cgg	cgt	cag	gct	tcg	tat	cgc	ctg	cgt	cag	gcg	gac		1008
Arg	Pro	Phe	Glu	Arg	Arg	Gln	Ala	Ser	Tyr	Arg	Leu	Arg	Gln	Ala	Asp		
					325				330					335			
ggg	tcg	acg	gtc	gac	aag	ccg	ttg	gag	atc	cgt	tcc	agc	gtc	cat	ggc		1056
Gly	Ser	Thr	Val	Asp	Lys	Pro	Leu	Glu	Ile	Arg	Ser	Ser	Val	His	Gly		
			340					345					350				
ccg	gtc	ttc	gag	cgc	gcg	gac	ggc	acg	gcc	gtc	gcc	gtt	cgg	gtc	gcc		1104
Pro	Val	Phe	Glu	Arg	Ala	Asp	Gly	Thr	Ala	Val	Ala	Val	Arg	Val	Ala		
			355				360					365					
ggg	ctg	gat	cgg	ccg	ggc	atg	ctc	gag	cag	tat	ttc	gac	atg	atc	acg		1152

14/44

Gly	Leu	Asp	Arg	Pro	Gly	Met	Leu	Glu	Gln	Tyr	Phe	Asp	Met	Ile	Thr		
370						375					380						
gcg	gac	agc	ttc	gac	gac	tac	gaa	gcc	gct	atg	gcg	cgg	atg	cag	gtg	1200	
Ala	Asp	Ser	Phe	Asp	Asp	Tyr	Glu	Ala	Ala	Met	Ala	Arg	Met	Gln	Val		
385					390				395					400			
ccg	acc	ttc	aac	atc	gtc	tac	gcc	gac	cgc	gaa	ggg	acc	atc	aac	tac	1248	
Pro	Thr	Phe	Asn	Ile	Val	Tyr	Ala	Asp	Arg	Glu	Gly	Thr	Ile	Asn	Tyr		
			405						410					415			
agc	ttc	acg	gcg	tgg	cgc	cca	aac	ggg	ccg	agg	gcg	aca	tgc	cct	tct	1296	
Ser	Phe	Thr	Ala	Trp	Arg	Pro	Asn	Gly	Pro	Arg	Ala	Thr	Ser	Pro	Ser		
			420					425					430				
ggc	agg	ggc	tgc	gcc	ggg	cga	ttc	ctc	gcg	tta	ctg	tgg	act	gag	aca	1344	
Gly	Arg	Gly	Ser	Ala	Gly	Arg	Phe	Leu	Ala	Leu	Leu	Trp	Thr	Glu	Thr		
	435					440						445					
cac	ccc	tgg	acg	atc	tgc	cgc	gcg	tca	cca	atc	cgc	cgg	gcc	gct	tgc	1392	
His	Pro	Trp	Thr	Ile	Cys	Arg	Ala	Ser	Pro	Ile	Arg	Arg	Ala	Ala	Ser		
	450					455					460						
tgc	aga	act	cca	atg	atc	cgc	cgt	gga	cgc	cga	cct	ggc	ccg	tca	cct	1440	
Cys	Arg	Thr	Pro	Met	Ile	Arg	Arg	Gly	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Ser	Pro		
465					470				475					480			
aca	cgc	cca	ggg	act	tcc	cct	cct	atc	tgg	cgc	ccc	aga	cgc	gca	ctc	1488	
Thr	Arg	Pro	Gly	Thr	Ser	Pro	Pro	Ile	Trp	Arg	Pro	Arg	Arg	Ala	Leu		
			485					490						495			
cct	gcg	cgc	tca	gca	aag	cgt	gcg	tct	gat	gtc	gag	aac	gac	gac	ctg	1536	
Pro	Ala	Arg	Ser	Ala	Lys	Arg	Ala	Ser	Asp	Val	Glu	Asn	Asp	Asp	Leu		
			500					505					510				
acg	ctg	gaa	cgc	ttc	atg	gcg	ctg	cag	ttg	agc	cac	cgc	gcc	gtc	atg	1584	
Thr	Leu	Glu	Arg	Phe	Met	Ala	Leu	Gln	Leu	Ser	His	Arg	Ala	Val	Met		
	515					520					525						
gcc	gac	cgc	acc	ttg	ccg	gac	ctg	atc	ccg	gcc	gcc	ctg	atc	gac	ccc	1632	
Ala	Asp	Arg	Thr	Leu	Pro	Asp	Leu	Ile	Pro	Ala	Ala	Leu	Ile	Asp	Pro		
	530					535					540						
gat	ccc	gag	gtc	cag	gcg	gcg	gcg	cgc	ctg	ctg	gcg	gcg	tgg	gat	cgt	1680	
Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Ala	Ala	Ala	Arg	Leu	Leu	Ala	Ala	Trp	Asp	Arg		
545				550				555						560			
gag	ttc	acc	agc	gac	agc	cgc	gcc	gcc	ctg	ctg	ttc	gag	gaa	tgg	gcg	1728	

15/44

Glu Phe Thr Ser Asp Ser Arg Ala Ala Leu Leu Phe Glu Glu Trp Ala	
565	570 575
cgt ctg ttc gcc ggc cag aat ttc gcc ggc cag gcg ggt ttc gcc acg	1776
Arg Leu Phe Ala Gly Gln Asn Phe Ala Gly Gln Ala Gly Phe Ala Thr	
580	585 590
ccc tgg tcg ctg gat aag ccg gtc agc acc ccc tac ggc gtc cgc gac	1824
Pro Trp Ser Leu Asp Lys Pro Val Ser Thr Pro Tyr Gly Val Arg Asp	
595	600 605
ccc aag gcc gcc gtc gat caa ctg cgg acc gcc atc gcc aac acc aag	1872
Pro Lys Ala Ala Val Asp Gln Leu Arg Thr Ala Ile Ala Asn Thr Lys	
610	615 620
cgc aaa tac ggc gcg atc gac cgg ccg ttc ggc gac gcc tcg cgc atg	1920
Arg Lys Tyr Gly Ala Ile Asp Arg Pro Phe Gly Asp Ala Ser Arg Met	
625	630 635 640
atc ctg aac gat gtg att gtt ccg ggc gcc gcc gcc ggc tac ggc aac ctg	1968
Ile Leu Asn Asp Val Ile Val Pro Gly Ala Ala Gly Tyr Gly Asn Leu	
645	650 655
ggt tcc ttc cgg gtc ttc acc tgg tcc gat cct gac gaa aac ggg gtt	2016
Gly Ser Phe Arg Val Phe Thr Trp Ser Asp Pro Asp Glu Asn Gly Val	
660	665 670
cgc acg ccc gtc cac ggc gag acg tgg gtg gcg atg atc gag ttc tcc	2064
Arg Thr Pro Val His Gly Glu Thr Trp Val Ala Met Ile Glu Phe Ser	
675	680 685
acc ccg gtg cgg gcc tat ggc ctg atg agc tac ggc aat tct cgc cag	2112
Thr Pro Val Arg Ala Tyr Gly Leu Met Ser Tyr Gly Asn Ser Arg Gln	
690	695 700
ccg ggc acg acg cac tac agc gat cag atc gaa cgc gtg tcg cgg gcc	2160
Pro Gly Thr Thr His Tyr Ser Asp Gln Ile Glu Arg Val Ser Arg Ala	
705	710 715 720
gac ttc cgc gag ctg ttg ctg cgg cga gag cag gtc gag gcc gcc gtc	2208
Asp Phe Arg Glu Leu Leu Leu Arg Arg Glu Gln Val Glu Ala Ala Val	
725	730 735
cag gaa cgc acg ccc ttc aac ttc aag cca tga	2241
Gln Glu Arg Thr Pro Phe Asn Phe Lys Pro	
740	745

16/44

<210> 17  
 <211> 746  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<400> 17

Met Thr Thr Asn Pro Gly Val Ser Ala Trp Gln Val Asn Thr Ala Tyr  
 1 5 10 15

Thr Ala Gly Gln Leu Val Thr Tyr Asn Gly Lys Thr Tyr Lys Cys Leu  
 20 25 30

Gln Pro His Thr Ser Leu Ala Gly Trp Glu Pro Ser Asn Val Pro Ala  
 35 40 45

Leu Trp Gln Leu Gln Gly Thr Leu Ala Glu Pro Thr Ser Thr Pro Gln  
 50 55 60

Ala Pro Ile Ala Ala Tyr Lys Pro Arg Ser Asn Glu Ile Leu Trp Asp  
 65 70 75 80

Gly Tyr Gly Val Pro His Ile Tyr Gly Val Asp Ala Pro Ser Ala Phe  
 85 90 95

Tyr Gly Tyr Gly Trp Ala Gln Ala Arg Ser His Gly Asp Asn Ile Leu  
 100 105 110

Arg Leu Tyr Gly Glu Ala Arg Gly Lys Gly Ala Glu Tyr Trp Gly Pro  
 115 120 125

Asp Tyr Glu Gln Thr Thr Val Trp Leu Leu Thr Asn Gly Val Pro Glu  
 130 135 140

Arg Ala Gln Gln Trp Tyr Ala Gln Gln Ser Pro Asp Phe Arg Ala Asn  
 145 150 155 160

Leu Asp Ala Phe Ala Ala Gly Ile Asn Ala Tyr Ala Gln Gln Asn Pro  
 165 170 175

Asp Asp Ile Ser Pro Glu Val Arg Gln Val Leu Pro Val Ser Gly Ala  
 180 185 190

Asp Val Val Ala His Ala His Arg Leu Met Asn Phe Leu Tyr Val Ala  
 195 200 205

Ser Pro Gly Arg Thr Leu Gly Glu Gly Asp Pro Pro Asp Leu Ala Asp  
 210 215 220

17/44

Gln Gly Ser Asn Ser Trp Ala Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Asn Gly  
 225 230 235 240  
 Asn Ala Leu Leu Leu Gln Asn Pro His Leu Ser Trp Thr Thr Asp Tyr  
 245 250 255  
 Phe Thr Tyr Tyr Glu Ala His Leu Val Thr Pro Asp Phe Glu Ile Tyr  
 260 265 270  
 Gly Ala Thr Gln Ile Gly Leu Pro Val Ile Arg Phe Ala Phe Asn Gln  
 275 280 285  
 Arg Met Gly Ile Thr Asn Thr Val Asn Gly Met Val Gly Ala Thr Asn  
 290 295 300  
 Tyr Arg Leu Thr Leu Gln Gly Asp Gly Tyr Leu Tyr Asp Gly Gln Val  
 305 310 315 320  
 Arg Pro Phe Glu Arg Arg Gln Ala Ser Tyr Arg Leu Arg Gln Ala Asp  
 325 330 335  
 Gly Ser Thr Val Asp Lys Pro Leu Glu Ile Arg Ser Ser Val His Gly  
 340 345 350  
 Pro Val Phe Glu Arg Ala Asp Gly Thr Ala Val Ala Val Arg Val Ala  
 355 360 365  
 Gly Leu Asp Arg Pro Gly Met Leu Glu Gln Tyr Phe Asp Met Ile Thr  
 370 375 380  
 Ala Asp Ser Phe Asp Asp Tyr Glu Ala Ala Met Ala Arg Met Gln Val  
 385 390 395 400  
 Pro Thr Phe Asn Ile Val Tyr Ala Asp Arg Glu Gly Thr Ile Asn Tyr  
 405 410 415  
 Ser Phe Thr Ala Trp Arg Pro Asn Gly Pro Arg Ala Thr Ser Pro Ser  
 420 425 430  
 Gly Arg Gly Ser Ala Gly Arg Phe Leu Ala Leu Leu Trp Thr Glu Thr  
 435 440 445  
 His Pro Trp Thr Ile Cys Arg Ala Ser Pro Ile Arg Arg Ala Ala Ser  
 450 455 460  
 Cys Arg Thr Pro Met Ile Arg Arg Gly Arg Arg Pro Gly Pro Ser Pro  
 465 470 475 480

18/44

Thr Arg Pro Gly Thr Ser Pro Pro Ile Trp Arg Pro Arg Arg Ala Leu  
485 490 495

Pro Ala Arg Ser Ala Lys Arg Ala Ser Asp Val Glu Asn Asp Asp Leu  
500 505 510

Thr Leu Glu Arg Phe Met Ala Leu Gln Leu Ser His Arg Ala Val Met  
515 520 525

Ala Asp Arg Thr Leu Pro Asp Leu Ile Pro Ala Ala Leu Ile Asp Pro  
530 535 540

Asp Pro Glu Val Gln Ala Ala Ala Arg Leu Leu Ala Ala Trp Asp Arg  
545 550 555 560

Glu Phe Thr Ser Asp Ser Arg Ala Ala Leu Leu Phe Glu Glu Trp Ala  
565 570 575

Arg Leu Phe Ala Gly Gln Asn Phe Ala Gly Gln Ala Gly Phe Ala Thr  
580 585 590

Pro Trp Ser Leu Asp Lys Pro Val Ser Thr Pro Tyr Gly Val Arg Asp  
595 600 605

Pro Lys Ala Ala Val Asp Gln Leu Arg Thr Ala Ile Ala Asn Thr Lys  
610 615 620

Arg Lys Tyr Gly Ala Ile Asp Arg Pro Phe Gly Asp Ala Ser Arg Met  
625 630 635 640

Ile Leu Asn Asp Val Ile Val Pro Gly Ala Ala Gly Tyr Gly Asn Leu  
645 650 655

Gly Ser Phe Arg Val Phe Thr Trp Ser Asp Pro Asp Glu Asn Gly Val  
660 665 670

Arg Thr Pro Val His Gly Glu Thr Trp Val Ala Met Ile Glu Phe Ser  
675 680 685

Thr Pro Val Arg Ala Tyr Gly Leu Met Ser Tyr Gly Asn Ser Arg Gln  
690 695 700

Pro Gly Thr Thr His Tyr Ser Asp Gln Ile Glu Arg Val Ser Arg Ala  
705 710 715 720

Asp Phe Arg Glu Leu Leu Leu Arg Arg Glu Gln Val Glu Ala Ala Val  
725 730 735

19/44

Gln Glu Arg Thr Pro Phe Asn Phe Lys Pro  
740 745

<210> 18  
<211> 2241  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized CBD-fused GL-7ACA acylase sequence

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(2241)

<400> 18  
atg ctg gcc gag ccg acc tcg acg ccg cag gcg ccg att gcg gcc tat 48  
Met Leu Ala Glu Pro Thr Ser Thr Pro Gln Ala Pro Ile Ala Ala Tyr  
1 5 10 15

aaa ccg aga agc aat gag atc ctg tgg gac ggc tac ggc gtc ccg cac 96  
Lys Pro Arg Ser Asn Glu Ile Leu Trp Asp Gly Tyr Gly Val Pro His  
20 25 30

atc tac ggg gtc gac gcg ccc tca gcc ttc tac ggc tac ggc tgg gcc 144  
Ile Tyr Gly Val Asp Ala Pro Ser Ala Phe Tyr Gly Tyr Gly Trp Ala  
35 40 45

cag gcg cgc agc cac ggc gac aat atc ctg cgc ctg tat gga gaa gcg 192  
Gln Ala Arg Ser His Gly Asp Asn Ile Leu Arg Leu Tyr Gly Glu Ala  
50 55 60

cgg ggc aag ggg gcc gaa tac tgg ggc ccg gat tac gaa cag acg acc 240  
Arg Gly Lys Gly Ala Glu Tyr Trp Gly Pro Asp Tyr Glu Gln Thr Thr  
65 70 75 80

gtc tgg ctg ctg acc aac ggc gtg ccg gag cgc gcc cag cag tgg tat 288  
Val Trp Leu Leu Thr Asn Gly Val Pro Glu Arg Ala Gln Gln Trp Tyr  
85 90 95

gcg cag cag tcg cct gat ttc cgc gcc aac ctc gac gcc ttc gcg gcg 336  
Ala Gln Gln Ser Pro Asp Phe Arg Ala Asn Leu Asp Ala Phe Ala Ala  
100 105 110

ggc atc aac gcc tat gcg cag cag aac ccc gac gac atc tcg ccc gag 384  
Gly Ile Asn Ala Tyr Ala Gln Gln Asn Pro Asp Asp Ile Ser Pro Glu

20/44

115	120	125	
gtg cgg cag gtg ctg ccg gtc tcc ggc gcc gac gtg gtg gcc cac gcc Val Arg Gln Val Leu Pro Val Ser Gly Ala Asp Val Val Ala His Ala 130 135 140			432
cat cgc ctg atg aac ttc ctc tat gtc gcg tcg ccc ggc cgc acc ctg His Arg Leu Met Asn Phe Leu Tyr Val Ala Ser Pro Gly Arg Thr Leu 145 150 155 160			480
ggc gag ggc gac ccg ccg gac ctg gcc gat cag gga tcc aac tcc tgg Gly Glu Gly Asp Pro Pro Asp Leu Ala Asp Gln Gly Ser Asn Ser Trp 165 170 175			528
gct gtg gcg ccg ggc aag acg gcc aat ggg aac gcc ctg ctg ctg cag Ala Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Asn Gly Asn Ala Leu Leu Leu Gln 180 185 190			576
aac ccg cac ctg tcc tgg acg acg gac tac ttc acc tac tac gag gcg Asn Pro His Leu Ser Trp Thr Thr Asp Tyr Phe Thr Tyr Tyr Glu Ala 195 200 205			624
cat ctc gtc acg ccg gac ttc gaa atc tat ggc gcg acc cag atc ggc His Leu Val Thr Pro Asp Phe Glu Ile Tyr Gly Ala Thr Gln Ile Gly 210 215 220			672
ctg ccg gtc atc cgc ttc gcc ttc aat cag cgg atg ggc atc acc aat Leu Pro Val Ile Arg Phe Ala Phe Asn Gln Arg Met Gly Ile Thr Asn 225 230 235 240			720
acc gtc aac ggc atg gtg ggg gcc acc aac tat cgg ctg acg ctt cag Thr Val Asn Gly Met Val Gly Ala Thr Asn Tyr Arg Leu Thr Leu Gln 245 250 255			768
ggc gac ggc tat ctg tat gac ggt cag gtg cgg ccg ttc gag cgg cgt Gly Asp Gly Tyr Leu Tyr Asp Gly Gln Val Arg Pro Phe Glu Arg Arg 260 265 270			816
cag gct tcg tat cgc ctg cgt cag gcg gac ggg tcg acg gtc gac aag Gln Ala Ser Tyr Arg Leu Arg Gln Ala Asp Gly Ser Thr Val Asp Lys 275 280 285			864
ccg ttg gag atc cgt tcc agc gtc cat ggc ccg gtc ttc gag cgc gcg Pro Leu Glu Ile Arg Ser Ser Val His Gly Pro Val Phe Glu Arg Ala 290 295 300			912
gac ggc acg gcc gtc gcc gtt cgg gtc gcc ggt ctg gat cgg ccg ggc Asp Gly Thr Ala Val Ala Val Arg Val Ala Gly Leu Asp Arg Pro Gly 310 315 320			960



21/44

305	310	315	320	
atg ctc gag cag tat ttc gac atg atc acg gcg gac agc ttc gac gac				1008
Met Leu Glu Gln Tyr Phe Asp Met Ile Thr Ala Asp Ser Phe Asp Asp				
	325	330	335	
tac gaa gcc gct atg gcg cgg atg cag gtg ccg acc ttc aac atc gtc				1056
Tyr Glu Ala Ala Met Ala Arg Met Gln Val Pro Thr Phe Asn Ile Val				
	340	345	350	
tac gcc gac cgc gaa ggg acc atc aac tac agc ttc acg gcg tgg cgc				1104
Tyr Ala Asp Arg Glu Gly Thr Ile Asn Tyr Ser Phe Thr Ala Trp Arg				
	355	360	365	
cca aac ggg ccg agg gcg aca tcg cct tct ggc agg ggc tcg gcc ggg				1152
Pro Asn Gly Pro Arg Ala Thr Ser Pro Ser Gly Arg Gly Ser Ala Gly				
	370	375	380	
cga ttc ctc gcg tta ctg tgg act gag aca cac ccc tgg acg atc tgc				1200
Arg Phe Leu Ala Leu Leu Trp Thr Glu Thr His Pro Trp Thr Ile Cys				
	385	390	395	400
cgc gcg tca cca atc cgc cgg gcc gct tcg tgc aga act cca atg atc				1248
Arg Ala Ser Pro Ile Arg Arg Ala Ala Ser Cys Arg Thr Pro Met Ile				
	405	410	415	
cgc cgt gga cgc cga cct ggc ccg tca cct aca cgc cca ggg act tcc				1296
Arg Arg Gly Arg Arg Pro Gly Pro Ser Pro Thr Arg Pro Gly Thr Ser				
	420	425	430	
cct cct atc tgg cgc ccc aga cgc gca ctc cct gcg cgc tca gca aag				1344
Pro Pro Ile Trp Arg Pro Arg Arg Ala Leu Pro Ala Arg Ser Ala Lys				
	435	440	445	
cgt gcg tct gat gtc gag aac gac gac ctg acg ctg gaa cgc ttc atg				1392
Arg Ala Ser Asp Val Glu Asn Asp Asp Leu Thr Leu Glu Arg Phe Met				
	450	455	460	
gcg ctg cag ttg agc cac cgc gcc gtc atg gcc gac cgc acc ttg ccg				1440
Ala Leu Gln Leu Ser His Arg Ala Val Met Ala Asp Arg Thr Leu Pro				
	465	470	475	480
gac ctg atc ccg gcc gcc ctg atc gac ccc gat ccc gag gtc cag gcg				1488
Asp Leu Ile Pro Ala Ala Leu Ile Asp Pro Asp Pro Glu Val Gln Ala				
	485	490	495	
gcg gcg cgc ctg ctg gcg gcg tgg gat cgt gag ttc acc agc gac agc				1536
Ala Ala Arg Leu Leu Ala Ala Trp Asp Arg Glu Phe Thr Ser Asp Ser				

22/44

500	505	510	
cgc gcc gcc ctg ctg ttc gag gaa tgg gcg cgt ctg ttc gcc ggc cag Arg Ala Ala Leu Leu Phe Glu Glu Trp Ala Arg Leu Phe Ala Gly Gln 515 520 525			1584
aat ttc gcc ggc cag gcg ggt ttc gcc acg ccc tgg tcg ctg gat aag Asn Phe Ala Gly Gln Ala Gly Phe Ala Thr Pro Trp Ser Leu Asp Lys 530 535 540			1632
ccg gtc agc acc ccc tac ggc gtc cgc gac ccc aag gcc gcc gtc gat Pro Val Ser Thr Pro Tyr Gly Val Arg Asp Pro Lys Ala Ala Val Asp 545 550 555 560			1680
caa ctg cgg acc gcc atc gcc aac acc aag cgc aaa tac ggc gcg atc Gln Leu Arg Thr Ala Ile Ala Asn Thr Lys Arg Lys Tyr Gly Ala Ile 565 570 575			1728
gac cgg ccg ttc ggc gac gcc tcg cgc atg atc ctg aac gat gtg att Asp Arg Pro Phe Gly Asp Ala Ser Arg Met Ile Leu Asn Asp Val Ile 580 585 590			1776
gtt ccg ggc gcc gcc ggc tac ggc aac ctg ggt tcc ttc cgg gtc ttc Val Pro Gly Ala Ala Gly Tyr Gly Asn Leu Gly Ser Phe Arg Val Phe 595 600 605			1824
acc tgg tcc gat cct gac gaa aac ggg gtt cgc acg ccc gtc cac ggc Thr Trp Ser Asp Pro Asp Glu Asn Gly Val Arg Thr Pro Val His Gly 610 615 620			1872
gag acg tgg gtg gcg atg atc gag ttc tcc acc ccg gtg cgg gcc tat Glu Thr Trp Val Ala Met Ile Glu Phe Ser Thr Pro Val Arg Ala Tyr 625 630 635 640			1920
ggc ctg atg agc tac ggc aat tct cgc cag ccg ggc acg acg cac tac Gly Leu Met Ser Tyr Gly Asn Ser Arg Gln Pro Gly Thr Thr His Tyr 645 650 655			1968
agc gat cag atc gaa cgc gtg tcg cgg gcc gac ttc cgc gag ctg ttg Ser Asp Gln Ile Glu Arg Val Ser Arg Ala Asp Phe Arg Glu Leu Leu 660 665 670			2016
ctg cgg cga gag cag gtc gag gcc gcc gtc cag gaa cgc acg ccc ttc Leu Arg Arg Glu Gln Val Glu Ala Ala Val Gln Glu Arg Thr Pro Phe 675 680 685			2064
aac ttc aag cca ggt acc acg aca aat cct ggt gta tcc gct tgg cag Asn Phe Lys Pro Gly Thr Thr Thr Asn Pro Gly Val Ser Ala Trp Gln			2112

23/44

690                      695                      700  
 gtc aac aca gct tat act gcg gga caa ttg gtc aca tat aac ggc aag 2160  
 Val Asn Thr Ala Tyr Thr Ala Gly Gln Leu Val Thr Tyr Asn Gly Lys 720  
 705                      710                      715  
 acg tat aaa tgt ttg cag ccc cac acc tcc ttg gca gga tgg gaa cca 2208  
 Thr Tyr Lys Cys Leu Gln Pro His Thr Ser Leu Ala Gly Trp Glu Pro 735  
 725  
 tcc aac gtt cct gcc ttg tgg cag ctt caa tag 2241  
 Ser Asn Val Pro Ala Leu Trp Gln Leu Gln 745  
 740

<210> 19  
 <211> 746  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<400> 19  
 Met Leu Ala Glu Pro Thr Ser Thr Pro Gln Ala Pro Ile Ala Ala Tyr 15  
 1                      5                      10  
 Lys Pro Arg Ser Asn Glu Ile Leu Trp Asp Gly Tyr Gly Val Pro His 30  
 20                      25                      30  
 Ile Tyr Gly Val Asp Ala Pro Ser Ala Phe Tyr Gly Tyr Gly Trp Ala 45  
 35                      40                      45  
 Gln Ala Arg Ser His Gly Asp Asn Ile Leu Arg Leu Tyr Gly Glu Ala 60  
 50                      55                      60  
 Arg Gly Lys Gly Ala Glu Tyr Trp Gly Pro Asp Tyr Glu Gln Thr Thr 80  
 65                      70                      75                      80  
 Val Trp Leu Leu Thr Asn Gly Val Pro Glu Arg Ala Gln Gln Trp Tyr 95  
 85                      90                      95  
 Ala Gln Gln Ser Pro Asp Phe Arg Ala Asn Leu Asp Ala Phe Ala Ala 110  
 100                      105                      110  
 Gly Ile Asn Ala Tyr Ala Gln Gln Asn Pro Asp Asp Ile Ser Pro Glu 125  
 115                      120                      125  
 Val Arg Gln Val Leu Pro Val Ser Gly Ala Asp Val Val Ala His Ala 140  
 130                      135                      140

24/44

His Arg Leu Met Asn Phe Leu Tyr Val Ala Ser Pro Gly Arg Thr Leu  
145 150 155 160

Gly Glu Gly Asp Pro Pro Asp Leu Ala Asp Gln Gly Ser Asn Ser Trp  
165 170 175

Ala Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Asn Gly Asn Ala Leu Leu Leu Gln  
180 185 190

Asn Pro His Leu Ser Trp Thr Thr Asp Tyr Phe Thr Tyr Tyr Glu Ala  
195 200 205

His Leu Val Thr Pro Asp Phe Glu Ile Tyr Gly Ala Thr Gln Ile Gly  
210 215 220

Leu Pro Val Ile Arg Phe Ala Phe Asn Gln Arg Met Gly Ile Thr Asn  
225 230 235 240

Thr Val Asn Gly Met Val Gly Ala Thr Asn Tyr Arg Leu Thr Leu Gln  
245 250 255

Gly Asp Gly Tyr Leu Tyr Asp Gly Gln Val Arg Pro Phe Glu Arg Arg  
260 265 270

Gln Ala Ser Tyr Arg Leu Arg Gln Ala Asp Gly Ser Thr Val Asp Lys  
275 280 285

Pro Leu Glu Ile Arg Ser Ser Val His Gly Pro Val Phe Glu Arg Ala  
290 295 300

Asp Gly Thr Ala Val Ala Val Arg Val Ala Gly Leu Asp Arg Pro Gly  
305 310 315 320

Met Leu Glu Gln Tyr Phe Asp Met Ile Thr Ala Asp Ser Phe Asp Asp  
325 330 335

Tyr Glu Ala Ala Met Ala Arg Met Gln Val Pro Thr Phe Asn Ile Val  
340 345 350

Tyr Ala Asp Arg Glu Gly Thr Ile Asn Tyr Ser Phe Thr Ala Trp Arg  
355 360 365

Pro Asn Gly Pro Arg Ala Thr Ser Pro Ser Gly Arg Gly Ser Ala Gly  
370 375 380

Arg Phe Leu Ala Leu Leu Trp Thr Glu Thr His Pro Trp Thr Ile Cys  
385 390 395 400

25/44

Arg Ala Ser Pro Ile Arg Arg Ala Ala Ser Cys Arg Thr Pro Met Ile  
 405 410 415  
 Arg Arg Gly Arg Arg Pro Gly Pro Ser Pro Thr Arg Pro Gly Thr Ser  
 420 425 430  
 Pro Pro Ile Trp Arg Pro Arg Arg Ala Leu Pro Ala Arg Ser Ala Lys  
 435 440 445  
 Arg Ala Ser Asp Val Glu Asn Asp Asp Leu Thr Leu Glu Arg Phe Met  
 450 455 460  
 Ala Leu Gln Leu Ser His Arg Ala Val Met Ala Asp Arg Thr Leu Pro  
 465 470 475 480  
 Asp Leu Ile Pro Ala Ala Leu Ile Asp Pro Asp Pro Glu Val Gln Ala  
 485 490 495  
 Ala Ala Arg Leu Leu Ala Ala Trp Asp Arg Glu Phe Thr Ser Asp Ser  
 500 505 510  
 Arg Ala Ala Leu Leu Phe Glu Glu Trp Ala Arg Leu Phe Ala Gly Gln  
 515 520 525  
 Asn Phe Ala Gly Gln Ala Gly Phe Ala Thr Pro Trp Ser Leu Asp Lys  
 530 535 540  
 Pro Val Ser Thr Pro Tyr Gly Val Arg Asp Pro Lys Ala Ala Val Asp  
 545 550 555 560  
 Gln Leu Arg Thr Ala Ile Ala Asn Thr Lys Arg Lys Tyr Gly Ala Ile  
 565 570 575  
 Asp Arg Pro Phe Gly Asp Ala Ser Arg Met Ile Leu Asn Asp Val Ile  
 580 585 590  
 Val Pro Gly Ala Ala Gly Tyr Gly Asn Leu Gly Ser Phe Arg Val Phe  
 595 600 605  
 Thr Trp Ser Asp Pro Asp Glu Asn Gly Val Arg Thr Pro Val His Gly  
 610 615 620  
 Glu Thr Trp Val Ala Met Ile Glu Phe Ser Thr Pro Val Arg Ala Tyr  
 625 630 635 640  
 Gly Leu Met Ser Tyr Gly Asn Ser Arg Gln Pro Gly Thr Thr His Tyr  
 645 650 655

26/44

Ser Asp Gln Ile Glu Arg Val Ser Arg Ala Asp Phe Arg Glu Leu Leu  
                     660                    665                    670  
 Leu Arg Arg Glu Gln Val Glu Ala Ala Val Gln Glu Arg Thr Pro Phe  
                     675                    680                    685  
 Asn Phe Lys Pro Gly Thr Thr Thr Asn Pro Gly Val Ser Ala Trp Gln  
                     690                    695                    700  
 Val Asn Thr Ala Tyr Thr Ala Gly Gln Leu Val Thr Tyr Asn Gly Lys  
                     705                    710                    715                    720  
 Thr Tyr Lys Cys Leu Gln Pro His Thr Ser Leu Ala Gly Trp Glu Pro  
                     725                    730                    735  
 Ser Asn Val Pro Ala Leu Trp Gln Leu Gln  
                     740                    745

<210> 20  
 <211> 2247  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificially  
                     synthesized CBD-fused GL-7ACA acylase sequence

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(2247)

<400> 20  
 atg ctg gcc gag ccg acc tcg acg ccg cag gcg ccg att gcg gcc tat 48  
 Met Leu Ala Glu Pro Thr Ser Thr Pro Gln Ala Pro Ile Ala Ala Tyr  
   1                    5                    10                    15  
 aaa ccg aga agc aat gag atc ctg tgg gac ggc tac ggc gtc ccg cac 96  
 Lys Pro Arg Ser Asn Glu Ile Leu Trp Asp Gly Tyr Gly Val Pro His  
                     20                    25                    30  
 atc tac ggg gtc gac gcg ccc tca gcc ttc tac ggc tac ggc tgg gcc 144  
 Ile Tyr Gly Val Asp Ala Pro Ser Ala Phe Tyr Gly Tyr Gly Trp Ala  
                     35                    40                    45  
 cag gcg cgc agc cac ggc gac aat atc ctg cgc ctg tat gga gaa gcg 192  
 Gln Ala Arg Ser His Gly Asp Asn Ile Leu Arg Leu Tyr Gly Glu Ala  
                     50                    55                    60

27/44

cgg ggc aag ggg gcc gaa tac tgg ggc ccg gat tac gaa cag acg acc	240
Arg Gly Lys Gly Ala Glu Tyr Trp Gly Pro Asp Tyr Glu Gln Thr Thr	
65 70 75 80	
gtc tgg ctg ctg acc aac ggc gtg ccg gag cgc gcc cag cag tgg tat	288
Val Trp Leu Leu Thr Asn Gly Val Pro Glu Arg Ala Gln Gln Trp Tyr	
85 90 95	
gcg cag cag tcg cct gat ttc cgc gcc aac ctc gac gcc ttc gcg gcg	336
Ala Gln Gln Ser Pro Asp Phe Arg Ala Asn Leu Asp Ala Phe Ala Ala	
100 105 110	
ggc atc aac gcc tat gcg cag cag aac ccc gac gac atc tcg ccc gag	384
Gly Ile Asn Ala Tyr Ala Gln Gln Asn Pro Asp Asp Ile Ser Pro Glu	
115 120 125	
gtg cgg cag gtg ctg ccg gtc tcc ggc gcc gac gtg gtg gcc cac gcc	432
Val Arg Gln Val Leu Pro Val Ser Gly Ala Asp Val Val Ala His Ala	
130 135 140	
cat cgc ctg atg aac ttc ctc tat gtc gcg tcg ccc ggc cgc acc ctg	480
His Arg Leu Met Asn Phe Leu Tyr Val Ala Ser Pro Gly Arg Thr Leu	
145 150 155 160	
ggc ggt acc acg aca aat cct ggt gta tcc gct tgg cag gtc aac aca	528
Gly Gly Thr Thr Thr Asn Pro Gly Val Ser Ala Trp Gln Val Asn Thr	
165 170 175	
gct tat act gcg gga caa ttg gtc aca tat aac ggc aag acg tat aaa	576
Ala Tyr Thr Ala Gly Gln Leu Val Thr Tyr Asn Gly Lys Thr Tyr Lys	
180 185 190	
tgt ttg cag ccc cac acc tcc ttg gca gga tgg gaa cca tcc aac gtt	624
Cys Leu Gln Pro His Thr Ser Leu Ala Gly Trp Glu Pro Ser Asn Val	
195 200 205	
cct gcc ttg tgg cag ctt caa ggt acc gag ggc gac ccg ccg gac ctg	672
Pro Ala Leu Trp Gln Leu Gln Gly Thr Glu Gly Asp Pro Pro Asp Leu	
210 215 220	
gcc gat cag gga tcc aac tcc tgg gct gtg gcg ccg ggc aag acg gcc	720
Ala Asp Gln Gly Ser Asn Ser Trp Ala Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala	
225 230 235 240	
aat ggg aac gcc ctg ctg ctg cag aac ccg cac ctg tcc tgg acg acg	768
Asn Gly Asn Ala Leu Leu Leu Gln Asn Pro His Leu Ser Trp Thr Thr	
245 250 255	

28/44

gac tac ttc acc tac tac gag gcg cat ctc gtc acg ccg gac ttc gaa Asp Tyr Phe Thr Tyr Tyr Glu Ala His Leu Val Thr Pro Asp Phe Glu 260 265 270	816
atc tat ggc gcg acc cag atc ggc ctg ccg gtc atc cgc ttc gcc ttc Ile Tyr Gly Ala Thr Gln Ile Gly Leu Pro Val Ile Arg Phe Ala Phe 275 280 285	864
aat cag cgg atg ggc atc acc aat acc gtc aac ggc atg gtg ggg gcc Asn Gln Arg Met Gly Ile Thr Asn Thr Val Asn Gly Met Val Gly Ala 290 295 300	912
acc aac tat cgg ctg acg ctt cag ggc gac ggc tat ctg tat gac ggt Thr Asn Tyr Arg Leu Thr Leu Gln Gly Asp Gly Tyr Leu Tyr Asp Gly 305 310 315 320	960
cag gtg cgg ccg ttc gag cgg cgt cag gct tcg tat cgc ctg cgt cag Gln Val Arg Pro Phe Glu Arg Arg Gln Ala Ser Tyr Arg Leu Arg Gln 325 330 335	1008
gcg gac ggg tcg acg gtc gac aag ccg ttg gag atc cgt tcc agc gtc Ala Asp Gly Ser Thr Val Asp Lys Pro Leu Glu Ile Arg Ser Ser Val 340 345 350	1056
cat ggc ccg gtc ttc gag cgc gcg gac ggc acg gcc gtc gcc gtt cgg His Gly Pro Val Phe Glu Arg Ala Asp Gly Thr Ala Val Ala Val Arg 355 360 365	1104
gtc gcc ggt ctg gat cgg ccg ggc atg ctc gag cag tat ttc gac atg Val Ala Gly Leu Asp Arg Pro Gly Met Leu Glu Gln Tyr Phe Asp Met 370 375 380	1152
atc acg gcg gac agc ttc gac gac tac gaa gcc gct atg gcg cgg atg Ile Thr Ala Asp Ser Phe Asp Asp Tyr Glu Ala Ala Met Ala Arg Met 385 390 395 400	1200
cag gtg ccg acc ttc aac atc gtc tac gcc gac cgc gaa ggg acc atc Gln Val Pro Thr Phe Asn Ile Val Tyr Ala Asp Arg Glu Gly Thr Ile 405 410 415	1248
aac tac agc ttc acg gcg tgg cgc cca aac ggg ccg agg gcg aca tcg Asn Tyr Ser Phe Thr Ala Trp Arg Pro Asn Gly Pro Arg Ala Thr Ser 420 425 430	1296
cct tct ggc agg ggc tcg gcc ggg cga ttc ctc gcg tta ctg tgg act Pro Ser Gly Arg Gly Ser Ala Gly Arg Phe Leu Ala Leu Leu Trp Thr 435 440 445	1344



29/44

gag aca cac ccc tgg acg atc tgc cgc gcg tca cca atc cgc cgg gcc Glu Thr His Pro Trp Thr Ile Cys Arg Ala Ser Pro Ile Arg Arg Ala 450 455 460	1392
gct tcg tgc aga act cca atg atc cgc cgt gga cgc cga cct ggc ccg Ala Ser Cys Arg Thr Pro Met Ile Arg Arg Gly Arg Arg Pro Gly Pro 465 470 475 480	1440
tca cct aca cgc cca ggg act tcc cct cct atc tgg cgc ccc aga cgc Ser Pro Thr Arg Pro Gly Thr Ser Pro Pro Ile Trp Arg Pro Arg Arg 485 490 495	1488
gca ctc cct gcg cgc tca gca aag cgt gcg tct gat gtc gag aac gac Ala Leu Pro Ala Arg Ser Ala Lys Arg Ala Ser Asp Val Glu Asn Asp 500 505 510	1536
gac ctg acg ctg gaa cgc ttc atg gcg ctg cag ttg agc cac cgc gcc Asp Leu Thr Leu Glu Arg Phe Met Ala Leu Gln Leu Ser His Arg Ala 515 520 525	1584
gtc atg gcc gac cgc acc ttg ccg gac ctg atc ccg gcc gcc ctg atc Val Met Ala Asp Arg Thr Leu Pro Asp Leu Ile Pro Ala Ala Leu Ile 530 535 540	1632
gac ccc gat ccc gag gtc cag gcg gcg gcg cgc ctg ctg gcg gcg tgg Asp Pro Asp Pro Glu Val Gln Ala Ala Ala Arg Leu Leu Ala Ala Trp 545 550 555 560	1680
gat cgt gag ttc acc agc gac agc cgc gcc gcc ctg ctg ttc gag gaa Asp Arg Glu Phe Thr Ser Asp Ser Arg Ala Ala Leu Leu Phe Glu Glu 565 570 575	1728
tgg gcg cgt ctg ttc gcc ggc cag aat ttc gcc ggc cag gcg ggt ttc Trp Ala Arg Leu Phe Ala Gly Gln Asn Phe Ala Gly Gln Ala Gly Phe 580 585 590	1776
gcc acg ccc tgg tcg ctg gat aag ccg gtc agc acc ccc tac ggc gtc Ala Thr Pro Trp Ser Leu Asp Lys Pro Val Ser Thr Pro Tyr Gly Val 595 600 605	1824
cgc gac ccc aag gcc gcc gtc gat caa ctg cgg acc gcc atc gcc aac Arg Asp Pro Lys Ala Ala Val Asp Gln Leu Arg Thr Ala Ile Ala Asn 610 615 620	1872
acc aag cgc aaa tac ggc gcg atc gac cgg ccg ttc ggc gac gcc tcg Thr Lys Arg Lys Tyr Gly Ala Ile Asp Arg Pro Phe Gly Asp Ala Ser 625 630 635 640	1920

30/44

cgc atg atc ctg aac gat gtg att gtt ccg ggc gcc gcc ggc tac ggc 1968  
 Arg Met Ile Leu Asn Asp Val Ile Val Pro Gly Ala Ala Gly Tyr Gly  
 645 650 655

aac ctg ggt tcc ttc cgg gtc ttc acc tgg tcc gat cct gac gaa aac 2016  
 Asn Leu Gly Ser Phe Arg Val Phe Thr Trp Ser Asp Pro Asp Glu Asn  
 660 665 670

ggg gtt cgc acg ccc gtc cac ggc gag acg tgg gtg gcg atg atc gag 2064  
 Gly Val Arg Thr Pro Val His Gly Glu Thr Trp Val Ala Met Ile Glu  
 675 680 685

ttc tcc acc ccg gtg cgg gcc tat ggc ctg atg agc tac ggc aat tct 2112  
 Phe Ser Thr Pro Val Arg Ala Tyr Gly Leu Met Ser Tyr Gly Asn Ser  
 690 695 700

cgc cag ccg ggc acg acg cac tac agc gat cag atc gaa cgc gtg tcg 2160  
 Arg Gln Pro Gly Thr Thr His Tyr Ser Asp Gln Ile Glu Arg Val Ser  
 705 710 715 720

cgg gcc gac ttc cgc gag ctg ttg ctg cgg cga gag cag gtc gag gcc 2208  
 Arg Ala Asp Phe Arg Glu Leu Leu Leu Arg Arg Glu Gln Val Glu Ala  
 725 730 735

gcc gtc cag gaa cgc acg ccc ttc aac ttc aag cca tag 2247  
 Ala Val Gln Glu Arg Thr Pro Phe Asn Phe Lys Pro  
 740 745

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 748

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 21

Met Leu Ala Glu Pro Thr Ser Thr Pro Gln Ala Pro Ile Ala Ala Tyr  
 1 5 10 15

Lys Pro Arg Ser Asn Glu Ile Leu Trp Asp Gly Tyr Gly Val Pro His  
 20 25 30

Ile Tyr Gly Val Asp Ala Pro Ser Ala Phe Tyr Gly Tyr Gly Trp Ala  
 35 40 45

Gln Ala Arg Ser His Gly Asp Asn Ile Leu Arg Leu Tyr Gly Glu Ala  
 50 55 60

31/44

Arg Gly Lys Gly Ala Glu Tyr Trp Gly Pro Asp Tyr Glu Gln Thr Thr  
 65 70 75 80  
 Val Trp Leu Leu Thr Asn Gly Val Pro Glu Arg Ala Gln Gln Trp Tyr  
 85 90 95  
 Ala Gln Gln Ser Pro Asp Phe Arg Ala Asn Leu Asp Ala Phe Ala Ala  
 100 105 110  
 Gly Ile Asn Ala Tyr Ala Gln Gln Asn Pro Asp Asp Ile Ser Pro Glu  
 115 120 125  
 Val Arg Gln Val Leu Pro Val Ser Gly Ala Asp Val Val Ala His Ala  
 130 135 140  
 His Arg Leu Met Asn Phe Leu Tyr Val Ala Ser Pro Gly Arg Thr Leu  
 145 150 155 160  
 Gly Gly Thr Thr Thr Asn Pro Gly Val Ser Ala Trp Gln Val Asn Thr  
 165 170 175  
 Ala Tyr Thr Ala Gly Gln Leu Val Thr Tyr Asn Gly Lys Thr Tyr Lys  
 180 185 190  
 Cys Leu Gln Pro His Thr Ser Leu Ala Gly Trp Glu Pro Ser Asn Val  
 195 200 205  
 Pro Ala Leu Trp Gln Leu Gln Gly Thr Glu Gly Asp Pro Pro Asp Leu  
 210 215 220  
 Ala Asp Gln Gly Ser Asn Ser Trp Ala Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala  
 225 230 235 240  
 Asn Gly Asn Ala Leu Leu Leu Gln Asn Pro His Leu Ser Trp Thr Thr  
 245 250 255  
 Asp Tyr Phe Thr Tyr Tyr Glu Ala His Leu Val Thr Pro Asp Phe Glu  
 260 265 270  
 Ile Tyr Gly Ala Thr Gln Ile Gly Leu Pro Val Ile Arg Phe Ala Phe  
 275 280 285  
 Asn Gln Arg Met Gly Ile Thr Asn Thr Val Asn Gly Met Val Gly Ala  
 290 295 300  
 Thr Asn Tyr Arg Leu Thr Leu Gln Gly Asp Gly Tyr Leu Tyr Asp Gly  
 305 310 315 320

Gln Val Arg Pro Phe Glu Arg Arg Gln Ala Ser Tyr Arg Leu Arg Gln  
 325 330 335  
 Ala Asp Gly Ser Thr Val Asp Lys Pro Leu Glu Ile Arg Ser Ser Val  
 340 345 350  
 His Gly Pro Val Phe Glu Arg Ala Asp Gly Thr Ala Val Ala Val Arg  
 355 360 365  
 Val Ala Gly Leu Asp Arg Pro Gly Met Leu Glu Gln Tyr Phe Asp Met  
 370 375 380  
 Ile Thr Ala Asp Ser Phe Asp Asp Tyr Glu Ala Ala Met Ala Arg Met  
 385 390 395 400  
 Gln Val Pro Thr Phe Asn Ile Val Tyr Ala Asp Arg Glu Gly Thr Ile  
 405 410 415  
 Asn Tyr Ser Phe Thr Ala Trp Arg Pro Asn Gly Pro Arg Ala Thr Ser  
 420 425 430  
 Pro Ser Gly Arg Gly Ser Ala Gly Arg Phe Leu Ala Leu Leu Trp Thr  
 435 440 445  
 Glu Thr His Pro Trp Thr Ile Cys Arg Ala Ser Pro Ile Arg Arg Ala  
 450 455 460  
 Ala Ser Cys Arg Thr Pro Met Ile Arg Arg Gly Arg Arg Pro Gly Pro  
 465 470 475 480  
 Ser Pro Thr Arg Pro Gly Thr Ser Pro Pro Ile Trp Arg Pro Arg Arg  
 485 490 495  
 Ala Leu Pro Ala Arg Ser Ala Lys Arg Ala Ser Asp Val Glu Asn Asp  
 500 505 510  
 Asp Leu Thr Leu Glu Arg Phe Met Ala Leu Gln Leu Ser His Arg Ala  
 515 520 525  
 Val Met Ala Asp Arg Thr Leu Pro Asp Leu Ile Pro Ala Ala Leu Ile  
 530 535 540  
 Asp Pro Asp Pro Glu Val Gln Ala Ala Ala Arg Leu Leu Ala Ala Trp  
 545 550 555 560  
 Asp Arg Glu Phe Thr Ser Asp Ser Arg Ala Ala Leu Leu Phe Glu Glu  
 565 570 575

33/44

Trp Ala Arg Leu Phe Ala Gly Gln Asn Phe Ala Gly Gln Ala Gly Phe  
                   580                                  585                                  590  
 Ala Thr Pro Trp Ser Leu Asp Lys Pro Val Ser Thr Pro Tyr Gly Val  
                   595                                  600                                  605  
 Arg Asp Pro Lys Ala Ala Val Asp Gln Leu Arg Thr Ala Ile Ala Asn  
                   610                                  615                                  620  
 Thr Lys Arg Lys Tyr Gly Ala Ile Asp Arg Pro Phe Gly Asp Ala Ser  
                   625                                  630                                  635                                  640  
 Arg Met Ile Leu Asn Asp Val Ile Val Pro Gly Ala Ala Gly Tyr Gly  
                                   645                                  650                                  655  
 Asn Leu Gly Ser Phe Arg Val Phe Thr Trp Ser Asp Pro Asp Glu Asn  
                                   660                                  665                                  670  
 Gly Val Arg Thr Pro Val His Gly Glu Thr Trp Val Ala Met Ile Glu  
                   675                                  680                                  685  
 Phe Ser Thr Pro Val Arg Ala Tyr Gly Leu Met Ser Tyr Gly Asn Ser  
                   690                                  695                                  700  
 Arg Gln Pro Gly Thr Thr His Tyr Ser Asp Gln Ile Glu Arg Val Ser  
                   705                                  710                                  715                                  720  
 Arg Ala Asp Phe Arg Glu Leu Leu Leu Arg Arg Glu Gln Val Glu Ala  
                                   725                                  730                                  735  
 Ala Val Gln Glu Arg Thr Pro Phe Asn Phe Lys Pro  
                   740                                  745

<210> 22  
 <211> 52  
 <212> PRT  
 <213> Bacillus circulans

<210>  
 <220> CBD domain

<400> 22  
 Thr Thr Asn Pro Gly Val Ser Ala Trp Gln Val Asn Thr Ala Tyr Thr  
   1                  5                                  10                                  15  
 Ala Gly Gln Leu Val Thr Tyr Asn Gly Lys Thr Tyr Lys Cys Leu Gln  
                   20                                  25                                  30

34/44

Pro His Thr Ser Leu Ala Gly Trp Glu Pro Ser Asn Val Pro Ala Leu  
35 40 45

Trp Gln Leu Gln  
50

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 23

aagccaggta ccacgacaaa tcc

23

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 24

aattcgggat ccctattgaa gctgcc

26

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 25

ccaatgcgga gcggccgctg accgggtacg

30

&lt;210&gt; 26

35/44

<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized primer sequence

<400> 26  
ccgcccaccg gtaccccgcc gtcgtgcac

30

<210> 27  
<211> 3535  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized CBD-fused FR901379 acylase sequence

<220>  
<221> CDS  
<222> (953)..(3529)

<400> 27  
gagctcaatt ccggtatggt ggagaggccg atccagacgg tgggcggggc gaagaggctg 60  
tcggccaggc ccgttcgac gaggtcgaag atcgaggcgg cgtccggacc gtccaggatg 120  
gtgttctccg cgccgaccgc cagatagggc agcaggaaca cgtgcatctg ggccgagtgg 180  
tagagcggca gggagtgcac gggccggtcg gtcgcggcga ggccgagcgc ggtgatcgcg 240  
ctgacgtact cgtggaccag ggccccgtgc gtcatcatcg cgcccttggg cagggcggtg 300  
gtcccggagg tgtacagcag ctgcaccagg tcgtcggagg cgggcgggcg ccgcgggggtg 360  
aacgcccgtt ccgtctccag ggcgtcgagc agcgagccgg gcgcgtcgcg gagcgcgcgc 420  
accgggagtc cggcggggag ccgcccggcg aggtccgggt cggtcaggac gagggaggag 480  
ccggactggt cgaggaggtg ggccaggtcg tcgccggtga ggttctggtt gaccggtacg 540  
tggaacgagc cggccccgtgc gcaggcgagg aagccgatca gataggcgtc ggagttgtgc 600  
gcgtaggcgg ccaccggtc gccgggggcg agagcggtact cctcgggtgag gacggcggcg 660

36/44

gccgtggaga cggcggcgtc cagggagcgg taggtccagg tccggtcggc gtaccgcacg 720  
 gcggtccggt cgggggtgcg ccgggcgctg cgggtgagga cgccgtcgac tgtgctgctg 780  
 cgtacacctg tcatggcgtg atcctgtgcg tccgggccct cgggggtcaa gaggtggat 840  
 accgaccaga cggttgacag cttcccgggc tccctggctg agtgacgctt ggccgtcccg 900  
 cggttccgga ccggccgcgc ccgtgccacc cgtaccgctg ggaggaaaca cc ttg acg 958  
 Leu Thr  
 tta cgc aac cgt ctg aga ctg ctc ggg gtc gcc ggt ctc gcc ctg ttc 1006  
 Leu Arg Asn Arg Leu Arg Leu Leu Gly Val Ala Gly Leu Ala Leu Phe  
 -35 -30 -25  
 acc gtg tcg gcg tcg ctg ccg cct gcc acc gcg tcc ggg acc cag gag 1054  
 Thr Val Ser Ala Ser Leu Pro Pro Ala Thr Ala Ser Gly Thr Gln Glu  
 -20 -15 -10  
 acg cgg cac ccg tcc ggg agc ggt ctt tcg gcc gtc atc cgg tac acg 1102  
 Thr Arg His Pro Ser Gly Ser Gly Leu Ser Ala Val Ile Arg Tyr Thr  
 -5 -1 1 5 10  
 gag tac ggc att ccg cac atc gtg gcg gag gac tac gcg cag ttg ggc 1150  
 Glu Tyr Gly Ile Pro His Ile Val Ala Glu Asp Tyr Ala Gln Leu Gly  
 15 20 25  
 ttc ggc acc ggc tgg gcg cag gcc gcc gat cag gtg tgc acg ctg gcg 1198  
 Phe Gly Thr Gly Trp Ala Gln Ala Ala Asp Gln Val Cys Thr Leu Ala  
 30 35 40  
 gac ggc ttc ctc acg gtg cgc ggg gag cgg tcg agg ttc ttc ggc ccg 1246  
 Asp Gly Phe Leu Thr Val Arg Gly Glu Arg Ser Arg Phe Phe Gly Pro  
 45 50 55  
 gac gcc gcc acg gac tac tcc ctc tcc tcg gcg gcg acg aac ctc tcc 1294  
 Asp Ala Ala Thr Asp Tyr Ser Leu Ser Ser Ala Ala Thr Asn Leu Ser  
 60 65 70 75  
 agc gac ctg tac ttc cgg ggc gtc cgc gac agc ggc acg gtg gag aag 1342  
 Ser Asp Leu Tyr Phe Arg Gly Val Arg Asp Ser Gly Thr Val Glu Lys  
 80 85 90  
 ctg ctc aag gag ccc gcg ccc gcc ggt ccg agc agg gac gtc aag gag 1390  
 Leu Leu Lys Glu Pro Ala Pro Ala Gly Pro Ser Arg Asp Val Lys Glu  
 95 100 105  
 acg atg cgc ggg ttc gcc gcc ggg tac aac gcg tgg atc gcg cag aac 1438



37/44

Thr	Met	Arg	Gly	Phe	Ala	Ala	Gly	Tyr	Asn	Ala	Trp	Ile	Ala	Gln	Asn		
		110					115					120					
cgg	atc	acc	gac	ccc	gcc	tgc	cgg	ggc	gcg	tcc	tgg	gtg	cgc	ccg	gtg	1486	
Arg	Ile	Thr	Asp	Pro	Ala	Cys	Arg	Gly	Ala	Ser	Trp	Val	Arg	Pro	Val		
	125					130					135						
acg	gcg	ctg	gac	gtg	gcg	gcg	cgc	ggc	tac	gcg	ctg	gcg	gtg	ctc	ggc	1534	
Thr	Ala	Leu	Asp	Val	Ala	Ala	Arg	Gly	Tyr	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Gly		
	140				145					150					155		
ggc	cag	ggg	cgc	ggc	atc	gac	ggc	atc	acc	gcg	gca	cag	ccg	ccg	acc	1582	
Gly	Gln	Gly	Arg	Gly	Ile	Asp	Gly	Ile	Thr	Ala	Ala	Gln	Pro	Pro	Thr		
				160					165						170		
gcc	gct	cct	ccg	gcg	gcc	ggg	gtc	acg	ccc	gag	gag	gcg	gcg	acg	gcg	1630	
Ala	Ala	Pro	Pro	Ala	Ala	Gly	Val	Thr	Pro	Glu	Glu	Ala	Ala	Thr	Ala		
			175					180					185				
gcg	gag	cgg	ctg	ctg	tcg	acg	cag	aac	gcg	gac	atg	ggt	tcc	aac	gcg	1678	
Ala	Glu	Arg	Leu	Leu	Ser	Thr	Gln	Asn	Ala	Asp	Met	Gly	Ser	Asn	Ala		
	190						195					200					
gtg	gcc	ttc	gac	ggc	tcc	acg	acg	gtg	aac	ggg	cgc	ggg	ctg	ttg	ctc	1726	
Val	Ala	Phe	Asp	Gly	Ser	Thr	Thr	Val	Asn	Gly	Arg	Gly	Leu	Leu	Leu		
	205					210					215						
ggc	aac	ccg	cac	tac	ccg	tgg	cag	ggc	gga	cgc	cgc	ttc	tgg	cag	gcg	1774	
Gly	Asn	Pro	His	Tyr	Pro	Trp	Gln	Gly	Gly	Arg	Arg	Phe	Trp	Gln	Ala		
	220				225					230					235		
cag	cag	acg	atc	ccc	ggc	gag	ctg	aac	gtg	tcg	ggc	gcg	tcc	ctg	ctg	1822	
Gln	Gln	Thr	Ile	Pro	Gly	Glu	Leu	Asn	Val	Ser	Gly	Ala	Ser	Leu	Leu		
				240					245					250			
ggc	gcg	acg	acg	atc	tcg	atc	ggg	cac	aac	gcc	gat	gtg	gcg	tgg	agc	1870	
Gly	Ala	Thr	Thr	Ile	Ser	Ile	Gly	His	Asn	Ala	Asp	Val	Ala	Trp	Ser		
			255					260					265				
cat	acg	gtc	gcc	acg	ggc	gtc	acg	ctg	aac	ctg	cat	cag	ctc	agc	ctc	1918	
His	Thr	Val	Ala	Thr	Gly	Val	Thr	Leu	Asn	Leu	His	Gln	Leu	Ser	Leu		
		270					275					280					
gat	ccg	gcc	gac	ccg	acc	gtc	tat	ctg	gtg	gac	ggg	aag	cgg	gag	cgg	1966	
Asp	Pro	Ala	Asp	Pro	Thr	Val	Tyr	Leu	Val	Asp	Gly	Lys	Arg	Glu	Arg		
	285					290					295						
atg	acg	cag	cgg	acg	gtg	agc	gtc	ccg	gtg	aag	ggc	ggg	gcc	gac	gtg	2014	

38/44

Met Thr Gln Arg Thr Val Ser Val Pro Val Lys Gly Gly Ala Asp Val	
300 305 310 315	
acc cgc acc cag tgg tgg acc cgc tac ggg ccg gtg gcc acc tcg atg	2062
Thr Arg Thr Gln Trp Trp Thr Arg Tyr Gly Pro Val Ala Thr Ser Met	
320 325 330	
ggc gcg ggg ctg ccg ttg ccg tgg acg gcg agc acg gcg tac gcg ctg	2110
Gly Ala Gly Leu Pro Leu Pro Trp Thr Ala Ser Thr Ala Tyr Ala Leu	
335 340 345	
aac gat ccg aac gcg acg aat ctg cgg atg gcg gac acc ggt ctg ggc	2158
Asn Asp Pro Asn Ala Thr Asn Leu Arg Met Ala Asp Thr Gly Leu Gly	
350 355 360	
ttc ggc aag gcc cgc tcc acg ggt gac gtc gag cgt gcg ctg cac cgg	2206
Phe Gly Lys Ala Arg Ser Thr Gly Asp Val Glu Arg Ala Leu His Arg	
365 370 375	
tcg cag ggc atg ccg tgg gtg aac acg atc gcg gcg gac cgg gcg ggt	2254
Ser Gln Gly Met Pro Trp Val Asn Thr Ile Ala Ala Asp Arg Ala Gly	
380 385 390 395	
cgc tcg ttc ttc gcg cag tcg cag gtg ctg ccg agg atc acc gac gcg	2302
Arg Ser Phe Phe Ala Gln Ser Gln Val Leu Pro Arg Ile Thr Asp Ala	
400 405 410	
ttg gcg gag cgc tgc tcg acc ccg ctg ggc cgg gcc acc tac ccc gct	2350
Leu Ala Glu Arg Cys Ser Thr Pro Leu Gly Arg Ala Thr Tyr Pro Ala	
415 420 425	
tcc ggc ctc gcg gtg ctg gac ggt tcg cgg acg gac tgc gcg ctg ggc	2398
Ser Gly Leu Ala Val Leu Asp Gly Ser Arg Thr Asp Cys Ala Leu Gly	
430 435 440	
agc gac ccg gac gcg gtg cgg ccg ggg atc ttc ggc ccg ggc cgg atg	2446
Ser Asp Pro Asp Ala Val Arg Pro Gly Ile Phe Gly Pro Gly Arg Met	
445 450 455	
ccg gtg ctg aag aac cag ccg tac gtg gag aac tcc aac gac agc gcg	2494
Pro Val Leu Lys Asn Gln Pro Tyr Val Glu Asn Ser Asn Asp Ser Ala	
460 465 470 475	
tgg ctg acc aat gcg gag cgg ccg ctg acc ggg tac gag cgg gtc ttc	2542
Trp Leu Thr Asn Ala Glu Arg Pro Leu Thr Gly Tyr Glu Arg Val Phe	
480 485 490	
ggc acg atc gcg acg ccc cgg tcg atg cgg acg cgc ggc gcg atc gag	2590

Gly	Thr	Ile	Ala	Thr	Pro	Arg	Ser	Met	Arg	Thr	Arg	Gly	Ala	Ile	Glu	
			495					500					505			
gac	gtc	gcg	tcg	atg	gcg	gac	cgg	ggc	cgc	ctc	cgg	gtc	ggg	gac	ctt	2638
Asp	Val	Ala	Ser	Met	Ala	Asp	Arg	Gly	Arg	Leu	Arg	Val	Gly	Asp	Leu	
		510					515					520				
cag	cgg	cag	cag	ttc	gcc	aac	cgt	gcg	ccg	gcc	ggg	gat	ctg	gcc	gcc	2686
Gln	Arg	Gln	Gln	Phe	Ala	Asn	Arg	Ala	Pro	Ala	Gly	Asp	Leu	Ala	Ala	
	525					530					535					
tcc	gag	gcc	gcc	aag	tgg	tgt	gcg	gcg	ctg	ccg	ggc	ggc	acg	gcc	gtg	2734
Ser	Glu	Ala	Ala	Lys	Trp	Cys	Ala	Ala	Leu	Pro	Gly	Gly	Thr	Ala	Val	
540					545					550					555	
ggc	tcc	gac	gga	acg	ccg	gtc	gac	gtg	tcg	gcg	gcc	tgc	cgg	gtg	ctg	2782
Gly	Ser	Asp	Gly	Thr	Pro	Val	Asp	Val	Ser	Ala	Ala	Cys	Arg	Val	Leu	
				560					565					570		
cgg	cgc	tgg	gac	cgg	acc	gtg	gac	agc	gac	agc	cgg	ggc	gcg	ctg	ctc	2830
Arg	Arg	Trp	Asp	Arg	Thr	Val	Asp	Ser	Asp	Ser	Arg	Gly	Ala	Leu	Leu	
			575					580					585			
ttc	gac	cgg	ttc	tgg	cgg	aag	gcg	tcg	tcg	gcg	ccc	gcc	gcc	gag	ctg	2878
Phe	Asp	Arg	Phe	Trp	Arg	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Pro	Ala	Ala	Glu	Leu	
		590					595					600				
tgg	agg	acg	ccg	ttc	gat	ccg	gcc	gac	ccg	gtg	cgc	act	ccg	cgc	ggc	2926
Trp	Arg	Thr	Pro	Phe	Asp	Pro	Ala	Asp	Pro	Val	Arg	Thr	Pro	Arg	Gly	
	605					610					615					
ctg	aac	acg	gcc	gcg	ccc	gtc	ctg	ggc	agg	gcc	ctg	gcg	gac	gcc	gtg	2974
Leu	Asn	Thr	Ala	Ala	Pro	Val	Leu	Gly	Arg	Ala	Leu	Ala	Asp	Ala	Val	
620					625					630					635	
gcg	gag	ctg	cgg	gcg	gcg	ggc	atc	gcg	ctg	gac	gcc	ccg	ctg	ggc	gag	3022
Ala	Glu	Leu	Arg	Ala	Ala	Gly	Ile	Ala	Leu	Asp	Ala	Pro	Leu	Gly	Glu	
				640					645					650		
cac	cag	ttc	gtc	gtg	cgg	aac	ggc	aag	cgg	ctc	ccg	atc	ggc	ggc	ggg	3070
His	Gln	Phe	Val	Val	Arg	Asn	Gly	Lys	Arg	Leu	Pro	Ile	Gly	Gly	Gly	
			655					660					665			
acg	gag	tcg	ctg	ggc	atc	tgg	aac	aag	acc	gag	ccg	cag	tgg	aac	gcg	3118
Thr	Glu	Ser	Leu	Gly	Ile	Trp	Asn	Lys	Thr	Glu	Pro	Gln	Trp	Asn	Ala	
		670					675					680				
gcg	ggc	ggc	ggc	tat	acg	gag	gtg	tcg	tcg	ggc	tcc	agc	tac	atc	cag	3166

Ala Gly Gly Gly Tyr Thr Glu Val Ser Ser Gly Ser Ser Tyr Ile Gln	
685 690 695	
gcg gtc ggc tgg gac gac agc cgc tgc ccg gtg gcc cgg acg ctg ctg	3214
Ala Val Gly Trp Asp Asp Ser Arg Cys Pro Val Ala Arg Thr Leu Leu	
700 705 710 715	
acg tac tcc cag tcg gag aac ccg aag tca ccg cac tac agc gac cag	3262
Thr Tyr Ser Gln Ser Glu Asn Pro Lys Ser Pro His Tyr Ser Asp Gln	
720 725 730	
acc agg ctg tac gcg ggt gag cgc tgg gtg acg tcc cgg ttc tgc gag	3310
Thr Arg Leu Tyr Ala Gly Glu Arg Trp Val Thr Ser Arg Phe Cys Glu	
735 740 745	
agg gac atc gcg cgt tcg ccg gac ctg cgg gtg gtg cgg gtg cac gag	3358
Arg Asp Ile Ala Arg Ser Pro Asp Leu Arg Val Val Arg Val His Glu	
750 755 760	
cgg cgg ggt acc acg aca aat cct ggt gta tcc gct tgg cag gtc aac	3406
Arg Arg Gly Thr Thr Thr Asn Pro Gly Val Ser Ala Trp Gln Val Asn	
765 770 775	
aca gct tat act gcg gga caa ttg gtc aca tat aac ggc aag acg tat	3454
Thr Ala Tyr Thr Ala Gly Gln Leu Val Thr Tyr Asn Gly Lys Thr Tyr	
780 785 790 795	
aaa tgt ttg cag ccc cac acc tcc ttg gca gga tgg gaa cca tcc aac	3502
Lys Cys Leu Gln Pro His Thr Ser Leu Ala Gly Trp Glu Pro Ser Asn	
800 805 810	
gtt cct gcc ttg tgg cag ctt caa tag ggatcc	3535
Val Pro Ala Leu Trp Gln Leu Gln	
815 820	

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 858

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 28

Leu Thr Leu Arg Asn Arg Leu Arg Leu Leu Gly Val Ala Gly Leu Ala  
 1 5 10 15

Leu Phe Thr Val Ser Ala Ser Leu Pro Pro Ala Thr Ala Ser Gly Thr  
 20 25 30

41/44

Gln Glu Thr Arg His Pro Ser Gly Ser Gly Leu Ser Ala Val Ile Arg  
                   35                                  40                                  45

Tyr Thr Glu Tyr Gly Ile Pro His Ile Val Ala Glu Asp Tyr Ala Gln  
           50                                  55                                  60

Leu Gly Phe Gly Thr Gly Trp Ala Gln Ala Ala Asp Gln Val Cys Thr  
   65                                  70                                  75                                  80

Leu Ala Asp Gly Phe Leu Thr Val Arg Gly Glu Arg Ser Arg Phe Phe  
                                   85                                  90                                  95

Gly Pro Asp Ala Ala Thr Asp Tyr Ser Leu Ser Ser Ala Ala Thr Asn  
                   100                                  105                                  110

Leu Ser Ser Asp Leu Tyr Phe Arg Gly Val Arg Asp Ser Gly Thr Val  
           115                                  120                                  125

Glu Lys Leu Leu Lys Glu Pro Ala Pro Ala Gly Pro Ser Arg Asp Val  
   130                                  135                                  140

Lys Glu Thr Met Arg Gly Phe Ala Ala Gly Tyr Asn Ala Trp Ile Ala  
  145                                  150                                  155                                  160

Gln Asn Arg Ile Thr Asp Pro Ala Cys Arg Gly Ala Ser Trp Val Arg  
                                   165                                  170                                  175

Pro Val Thr Ala Leu Asp Val Ala Ala Arg Gly Tyr Ala Leu Ala Val  
                   180                                  185                                  190

Leu Gly Gly Gln Gly Arg Gly Ile Asp Gly Ile Thr Ala Ala Gln Pro  
           195                                  200                                  205

Pro Thr Ala Ala Pro Pro Ala Ala Gly Val Thr Pro Glu Glu Ala Ala  
   210                                  215                                  220

Thr Ala Ala Glu Arg Leu Leu Ser Thr Gln Asn Ala Asp Met Gly Ser  
  225                                  230                                  235                                  240

Asn Ala Val Ala Phe Asp Gly Ser Thr Thr Val Asn Gly Arg Gly Leu  
                                   245                                  250                                  255

Leu Leu Gly Asn Pro His Tyr Pro Trp Gln Gly Gly Arg Arg Phe Trp  
           260                                  265                                  270

Gln Ala Gln Gln Thr Ile Pro Gly Glu Leu Asn Val Ser Gly Ala Ser  
   275                                  280                                  285

Leu Leu Gly Ala Thr Thr Ile Ser Ile Gly His Asn Ala Asp Val Ala  
 290 295 300

Trp Ser His Thr Val Ala Thr Gly Val Thr Leu Asn Leu His Gln Leu  
 305 310 315 320

Ser Leu Asp Pro Ala Asp Pro Thr Val Tyr Leu Val Asp Gly Lys Arg  
 325 330 335

Glu Arg Met Thr Gln Arg Thr Val Ser Val Pro Val Lys Gly Gly Ala  
 340 345 350

Asp Val Thr Arg Thr Gln Trp Trp Thr Arg Tyr Gly Pro Val Ala Thr  
 355 360 365

Ser Met Gly Ala Gly Leu Pro Leu Pro Trp Thr Ala Ser Thr Ala Tyr  
 370 375 380

Ala Leu Asn Asp Pro Asn Ala Thr Asn Leu Arg Met Ala Asp Thr Gly  
 385 390 395 400

Leu Gly Phe Gly Lys Ala Arg Ser Thr Gly Asp Val Glu Arg Ala Leu  
 405 410 415

His Arg Ser Gln Gly Met Pro Trp Val Asn Thr Ile Ala Ala Asp Arg  
 420 425 430

Ala Gly Arg Ser Phe Phe Ala Gln Ser Gln Val Leu Pro Arg Ile Thr  
 435 440 445

Asp Ala Leu Ala Glu Arg Cys Ser Thr Pro Leu Gly Arg Ala Thr Tyr  
 450 455 460

Pro Ala Ser Gly Leu Ala Val Leu Asp Gly Ser Arg Thr Asp Cys Ala  
 465 470 475 480

Leu Gly Ser Asp Pro Asp Ala Val Arg Pro Gly Ile Phe Gly Pro Gly  
 485 490 495

Arg Met Pro Val Leu Lys Asn Gln Pro Tyr Val Glu Asn Ser Asn Asp  
 500 505 510

Ser Ala Trp Leu Thr Asn Ala Glu Arg Pro Leu Thr Gly Tyr Glu Arg  
 515 520 525

Val Phe Gly Thr Ile Ala Thr Pro Arg Ser Met Arg Thr Arg Gly Ala  
 530 535 540

43/44

Ile Glu Asp Val Ala Ser Met Ala Asp Arg Gly Arg Leu Arg Val Gly  
 545 550 555 560  
 Asp Leu Gln Arg Gln Gln Phe Ala Asn Arg Ala Pro Ala Gly Asp Leu  
 565 570 575  
 Ala Ala Ser Glu Ala Ala Lys Trp Cys Ala Ala Leu Pro Gly Gly Thr  
 580 585 590  
 Ala Val Gly Ser Asp Gly Thr Pro Val Asp Val Ser Ala Ala Cys Arg  
 595 600 605  
 Val Leu Arg Arg Trp Asp Arg Thr Val Asp Ser Asp Ser Arg Gly Ala  
 610 615 620  
 Leu Leu Phe Asp Arg Phe Trp Arg Lys Ala Ser Ser Ala Pro Ala Ala  
 625 630 635 640  
 Glu Leu Trp Arg Thr Pro Phe Asp Pro Ala Asp Pro Val Arg Thr Pro  
 645 650 655  
 Arg Gly Leu Asn Thr Ala Ala Pro Val Leu Gly Arg Ala Leu Ala Asp  
 660 665 670  
 Ala Val Ala Glu Leu Arg Ala Ala Gly Ile Ala Leu Asp Ala Pro Leu  
 675 680 685  
 Gly Glu His Gln Phe Val Val Arg Asn Gly Lys Arg Leu Pro Ile Gly  
 690 695 700  
 Gly Gly Thr Glu Ser Leu Gly Ile Trp Asn Lys Thr Glu Pro Gln Trp  
 705 710 715 720  
 Asn Ala Ala Gly Gly Gly Tyr Thr Glu Val Ser Ser Gly Ser Ser Tyr  
 725 730 735  
 Ile Gln Ala Val Gly Trp Asp Asp Ser Arg Cys Pro Val Ala Arg Thr  
 740 745 750  
 Leu Leu Thr Tyr Ser Gln Ser Glu Asn Pro Lys Ser Pro His Tyr Ser  
 755 760 765  
 Asp Gln Thr Arg Leu Tyr Ala Gly Glu Arg Trp Val Thr Ser Arg Phe  
 770 775 780  
 Cys Glu Arg Asp Ile Ala Arg Ser Pro Asp Leu Arg Val Val Arg Val  
 785 790 795 800

His Glu Arg Arg Gly Thr Thr Thr Asn Pro Gly Val Ser Ala Trp Gln  
805 810 815

Val Asn Thr Ala Tyr Thr Ala Gly Gln Leu Val Thr Tyr Asn Gly Lys  
820 825 830

Thr Tyr Lys Cys Leu Gln Pro His Thr Ser Leu Ala Gly Trp Glu Pro  
835 840 845

Ser Asn Val Pro Ala Leu Trp Gln Leu Gln  
850 855



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07275

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 15/62, 1/21, 9/80, 11/12, C07K 17/12, 19/00, C12P 17/18, 21/02  
 //(C12N 9/80, C12R 1:19) (C12P 21/02, C12R 1:19) (C12N 9/80, C12R  
 1:465) (C12P 21/02, C12R 1:465)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 15/00-15/90, 9/78-9/86, C07K 14/00-14/825

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 WPI/L (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/  
 PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO, 94/24158, A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA), 27 October, 1994 (27.10.94) & AU, 9466347, A & EP, 695311, A1 & US, 5496934, A & JP, 8-509127, A & US, 5670623, A & US, 5719044, A & US, 5738984, A & US, 5837814, A	1-2, 7, 13-15 3-6, 8-12, 16-19
Y A	TAKESHI WATANABE et al., "The Roles of the C-Terminal Domain and Type III Domains of Chitinase A1 from <i>Bacillus circulans</i> WL-12 in Chitin Degradation.", Journal of Bacteriology (01 August, 1994), Vol.176, No.15, pp.4465-4472	3-6, 8-12, 16-19 1-2, 7, 13-15
Y A	JP, 7-313161, A (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 05 December, 1995 (05.12.95) (Family: none)	3-4, 8-12, 16, 18 1-2, 5-7, 13-15, 17, 19
Y A	WO, 97/32975, A1 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 12 September, 1997 (12.09.97)	5-6, 17, 19 1-4, 7-16, 18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
 10 January, 2001 (10.01.01)

Date of mailing of the international search report  
 23 January, 2001 (23.01.01)

Name and mailing address of the ISA/  
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& EP, 885957, A1 & CN, 1218507, A & KR, 99087515, A	
A	Peter Tomme et al., "Characterization and affinity applications of cellulose-binding domains.", Journal of Chromatography B (11 September, 1998) Vol.715, No.1, pp.283-296	1-19
A	Shaorong Chong et al., "Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element.", Gene (19 June, 1997) Vol.192, No.2, pp.271-281	1-19

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/62, 1/21, 9/80, 11/12, C07K 17/12, 19/00, C12P 17/18, 21/02  
 //(C12N 9/80, C12R 1:19) (C12P 21/02, C12R 1:19) (C12N 9/80, C12R 1:465) (C12P 21/02, C12R 1:465)

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/00-15/90, 9/78-9/86, C07K 14/00-14/825

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI/L (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE, GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	WO, 94/24158, A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 27. 10月. 1994 (27. 10. 94) & AU, 9466347, A & EP, 695311, A1 & US, 5496934, A & JP, 8-509127, A & US, 5670623, A & US, 5719044, A & US, 5738984, A & US, 5837814, A	1-2, 7, 13-15 3-6, 8-12, 16-19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.01.01

国際調査報告の発送日

23.01.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子



4N

2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>Y</u> A	TAKESHI WATANABE et al. "The Roles of the C-Terminal Domain and Type III Domains of Chitinase A1 from <i>Bacillus circulans</i> WL-12 in Chitin Degradation.", Journal of Bacteriology (Aug. 1, 1994) Vol. 176, No. 15, p. 4465-4472	3-6, 8-12, 16-19 1-2, 7, 13-15
<u>Y</u> A	JP, 7-313161, A (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 5. 12月. 1995 (05. 12. 95) (ファミリーなし)	3-4, 8-12, 16, 18 1-2, 5-7, 13-15, 17, 19
<u>Y</u> A	WO, 97/32975, A1 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 12. 9月. 1997 (12. 09. 97) & EP, 885957, A1 & CN, 1218507, A & KR, 99087515, A	5-6, 17, 19 1-4, 7-16, 18
A	Peter Tomme et al. "Characterization and affinity applications of cellulose-binding domains.", Journal of Chromatography B (Sept. 11, 1998) Vol. 715, No. 1, p. 283-296	1-19
A	Shaorong Chong et al. "Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element.", Gene (Jun. 19, 1997) Vol. 192, No. 2, p. 271-281	1-19